

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**“EFECTO ANTIVIRAL DE *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* Y *CHLORELLA SOROKINIANA* EN UN MODELO DE INFECCIÓN *IN VITRO*”**

**POR**

**Q.B.C. RICARDO ROMERO ARGUELLES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**ENERO, 2020**

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en la unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología en la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Laboratorio de Microbiología e Inmunología del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

**EFFECTO ANTIVIRAL DE *Bifidobacterium longum* Y *Chlorella sorokiniana* EN UN  
MODELO DE INFECCIÓN *IN VITRO***

**COMITÉ DE TESIS**



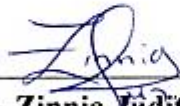
**Dra. Patricia Tamez Guerra**  
Presidente



**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**  
Secretario



**Dr. César Iván Romo Sáenz**  
Vocal



**Dra. Zinnia Judith Molina Garza**  
Vocal



**Dra. María Porfiria Barrón González**  
Vocal



**Dra. Guadalupe González Ochoa**  
Director externo

**EFFECTO ANTIVIRAL DE *Bifidobacterium longum* Y *Chlorella sorokiniana* EN UN  
MODELO DE INFECCIÓN *IN VITRO***

**Dirección de tesis:**



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**  
Presidente



---

**Dra. Guadalupe Gonzalez Ochoa**  
Director externo

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores la **Dra. Patricia Tamez Guerra** y la **Dra. Guadalupe González Ochoa** por su gran apoyo constante, así como sus enseñanzas y por permitirme formar parte de un gran equipo de trabajo. También una mención al resto de mi comité por su colaboración en el proyecto.

Al **Dr. César Iván Romo Sáenz** por apoyarme en la realización del proyecto, y por enseñarme que las cosas no son tan difíciles, aunque así las parezcan. A si como también su apoyo incondicional en todo momento.

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el departamento de Inmunología y Virología de la facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

A mis compañeros y personal del Laboratorio de Formulación de Biológicos que fueron de gran apoyo: **Nora Mares, Sofia Berny, Rosy Navarro, Rosa Flores, Dra. Norma, Dra. Marivel Treviño, Enriqueta Monreal, Angello Martínez, Laura Loera, Dr. Alonso Orozco, Laiju K, Viviana, David Cuevas, Ileana Méndez, Gerardo, Adán Galindo y Nohemí.**

A mis amigos **QBC. Karina Adame, QBC. Maribel Domínguez y QBC. Armando Avilés** por todos esos buenos momentos compartidos. Así como a mis compañeros de maestría quienes avanzaron junto conmigo en esta etapa: **Oziel Zúñiga, Katia González, Lucero Castro, Eder Iván, Gabriel Cazarez, Jessica Ramírez y Tania Heredia.**

Al gran equipo de trabajo de Posgrado **Mirthala Páez y Mónica del Roció**, por ayudarme en cualquier duda que surgía dentro del programa académico.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de este trabajo de maestría.

A mi familia por el apoyo y comprensión a lo largo de esta etapa de mi vida.

## DEDICATORIA

A mis padres **Ricardo Romero Ríos** y **Jesús Arguelles Samaniego**, gracias a su apoyo, amor y cariño que me han brindado he podido lograr una meta más en mi vida profesional. Gracias por compartir todos mis momentos de tristeza, alegría y por todo su apoyo, sin el cual todo hubiera sido más difícil, por ustedes seguiré adelante, hasta lograr realizar mis metas.

Mis hermanas **Adriana Romero Arguelles** y **María Concepción Romero Arguelles** que me han apoyado incondicionalmente en todo momento.

Mi esfuerzo y mi corazón para ustedes, siempre...

## TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
LUGAR TRABAJO .....	ii
COMITÉ DE TESIS .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIA .....	vi
TABLA DE CONTENIDO .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABLAS .....	xi
NOMENCLATURA .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Probióticos y Prebióticos .....	3
2.2 <i>Bifidobacterium longum</i> .....	5
2.3 <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	6
2.4 Gastroenteritis viral .....	7
2.5 Características de Rotavirus .....	7
2.6 Estrategias de evasión viral de virus entéricos .....	8
2.7 Respuesta inmune innata y características antigénicas .....	9
2.8 Respuesta inmune inducida por Rotavirus .....	11
3. JUSTIFICACIÓN .....	12
4. HIPOTESÍS .....	13
5. OBJETIVOS .....	14
5.1 Objetivo General .....	14
5.2 Objetivos Específicos .....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
6.1 Origen de las cepas bacterianas y virales .....	15

6.2 Cultivo de células HT-29.....	15
6.3 Condiciones de crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> .....	16
6.4 Producción y Cinética de Crecimiento de <i>B. longum</i> .....	17
6.5 Propagación de <i>Rotavirus wa</i> en células MA-104.....	18
6.6 Microtitulación de focos infecciosos.....	18
6.7 Multiplicidad de infección.....	19
6.8 Ensayo de viabilidad celular mediante el método del MTT .....	20
6.9 Tratamientos .....	20
6.9.1 Tratamiento control .....	21
6.9.2 Tratamientos Pre-Infección.....	21
6.9.3 Tratamientos Post-Infección.....	22
6.10 Evaluación del Efecto Citopático .....	22
6.11 Extracción de ARN total.....	22
6.12 Síntesis de ADNc.....	23
6.13 Análisis de expresión de genes.....	23
6.14 Método de determinación de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	24
6.15 Análisis estadístico .....	25
7 RESULTADOS .....	26
7.1 Propagación de cepas.....	26
7.1.1 Análisis de <i>Bifidobacterium longum</i> .....	26
7.1.2 Propagación de RV .....	27
7.2 Producción de <i>Chorella sorokiniana</i> .....	29
7.3 Microtitulación de focos infecciosos .....	30
7.4 Viabilidad celular .....	31
7.5 Inhibición del efecto citopático .....	33



7.6 Evaluación de interferones y precursores de interferón en células HT-29 en estado basal .....	36
7.7 Citocinas expresadas en células HT-29 tratadas con <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. longum</i> .....	36
7.8 Citocinas expresadas en células HT-29 infectadas con <i>Rotavirus wa</i> .....	39
7.9 Citocinas expresadas en células HT-29 infectadas con <i>Rotavirus wa</i> tratadas en la pre y post-infección con <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. longum</i> .....	41
8. DISCUSIÓN .....	47
9. CONCLUSIONES.....	50
10. PERSPECTIVAS.....	51
11. BIBLIOGRAFÍA .....	52
ANEXO 1 .....	63
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interacción probióticos y prebióticos en células intestinales .....	5
<b>Figura 2.</b> Interacción de rotavirus en el sistema innato del huésped .....	10
<b>Figura 3.</b> Morfología de <i>Bifidobacterium longum</i> (Tinción Gram) .....	26
<b>Figura 4.</b> Cinética de crecimiento de <i>Bifidobacterium longum</i> .....	27
<b>Figura 5.</b> Efecto citopático ocasionado por <i>Rotavirus wa</i> en células MA-104 .....	28
<b>Figura 6.</b> Prueba rápida “Detección de Rotavirus” .....	28
<b>Figura 7.</b> Cultivo de <i>C. sorokiniana</i> .....	29
<b>Figura 8.</b> Tinción de focos infecciosos .....	30
<b>Figura 9.</b> <i>C. sorokiniana</i> en contacto con células HT-29 .....	31
<b>Figura 10.</b> Efecto citotóxico de <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. longum</i> contra células HT-29.....	32
<b>Figura 11.</b> Efecto citopático en células HT-29 en la Pre-infección .....	34
<b>Figura 12.</b> Efecto citopático en células HT-29 en la Post-infección .....	35
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en Gel de agarosa de los precursores de INFs .....	36
<b>Figura 14.</b> Expresión génica de citocinas en células HT-29 expuestas a <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. longum</i> .....	38
<b>Figura 15.</b> Expresión génica de citocinas en células HT-29 infectadas con RV.....	39
<b>Figura 16.</b> Expresión de INF- $\alpha$ .....	41
<b>Figura 17.</b> Expresión de INF- $\beta$ .....	42
<b>Figura 18.</b> Expresión de IRF-3 .....	43
<b>Figura 19.</b> Expresión de IRF-5.....	44
<b>Figura 20.</b> Expresión de RIG-1.....	45
<b>Figura 21.</b> Expresión de SOCS3.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizados .....	24
<b>Tabla 2.</b> Nivel de expresión de citocinas en células HT-29 expuestas a <i>C. sorokiniana</i> y <i>B. longum</i> .....	36
<b>Tabla 3.</b> Nivel de expresión de citocinas en células HT-29 infectadas con RV.....	39

## NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
INF-α	Interferón Alpha
INF-β	Interferón beta
IRF-3	Precursor de interferón 3
IRF-5	Precursor de interferón 5
RIG-1	Gen inducible por ácido retinoico 1
SOCS3	Supresor de señalización de citocinas 3
INFs	Interferones
min	Minutos
mL	Mililitros
cm	Centímetros
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfatos
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
pH	Potencial de hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
UFC	Unidades formadoras de colonia
h	Hora
Mock	Control
MOI	Multiplicidad de infección
ng	Nanogramos
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
mM	Milimolar
SFB	Suero fetal bovino
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
OMS	Organización Mundial de la Salud
μM	Micromolar
mg	Miligramos

## RESUMEN

Los suplementos alimenticios con probióticos y prebióticos ha mostrado su potencial preventivo de infecciones por patógenos entéricos, debido a su capacidad de competir con receptores y sitios de adhesión en el intestino y a la modulación de la respuesta inmune. Ciertos virus patógenos entéricos poseen variaciones antigénicas y pueden producir proteínas que interfieren con la respuesta inmune innata del huésped, inhibiendo la vía de señalización de interferones (INFs), evadiendo la respuesta inmune incluso después de la vacunación. Por esto es necesario buscar alternativas para controlar este tipo de virus, y reducir la severidad sintomatológica por estos patógenos. En el presente trabajo se evaluó el efecto antiviral del probiótico *Bifidobacterium longum* y del prebiótico *Chlorella sorokiniana* en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa*. El efecto citopático de rotavirus en células HT-29 contra células no infectadas, mostró que con *C. sorokiniana* se redujo 10 % en la pre-infección a las 24 h y 20 % en la post-infección. Cuando las células se trataron con *B. longum*, se redujo hasta en un 20 % en la pre-infección y en la post-infección en 30%. Los niveles de expresión de INF- $\alpha$ , IRF-3, IRF-5, RIG-1 y SOCS3 aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* tratadas en combinación con *C. sorokiniana* y *B. longum* en la pre-infección, en comparación con células no infectadas. En conclusión, la combinación de *C. sorokiniana* y *B. longum* favorecen la expresión de citocinas encargadas de inducir la activación de la respuesta antiviral celular, esto permite disminuir el efecto citopático ocasionado por rotavirus.

## ABSTRACT

Food supplements with probiotics and prebiotics have shown their preventive potential for enteric pathogen infections, because of their potential to compete with receptors and adhesion sites in the intestine and modulate the immune response. Several enteric pathogenic viruses possess antigenic variations and produce proteins that interfere with the host innate immune response, inhibiting the interferon (INFs) signaling pathway and evading the immune response even after vaccination. Therefore, it is necessary to search for alternatives to control this type of virus and reduce the symptomatic severity of these pathogens. In the present study, the antiviral effect of the probiotic *Bifidobacterium longum* and the prebiotic *Chlorella sorokiniana* in HT-29 cells infected with *Rotavirus wa* was evaluated. The cytopathic effect of rotavirus in HT-29 cells against uninfected cells showed that with *C. sorokiniana* the pre-infection was reduced by 10% at 24 h and the post-infection by 20%. When the cells were treated with *B. longum*, it was reduced in pre-infection by up to 20% and in post-infection by 30%. Expression levels of INF- $\alpha$ , IRF-3, IRF-5, RIG-1 and SOCS3 significantly ( $p < 0.05$ ) increased in HT-29 cells infected with *Rotavirus wa* treated in combination with *C. sorokiniana* and *B. longum* in pre-infection, compared to uninfected cells. In conclusion, combination of *C. sorokiniana* and *B. longum* favors expression of cytokines responsible for inducing cellular antiviral response activation, allowing to reduce rotavirus-mediated cytopathic effect.

## 1. INTRODUCCIÓN

La microbiota del tracto gastrointestinal está compuesto por un gran número de microorganismos, del cual el colon es el sitio principal de colonización microbiana, encontrándose más de 500 especies diferentes de bacterias (Blaut et al., 2018). La microbiota intestinal juega un papel importante tanto en la salud humana como en el desarrollo de enfermedades (Muñoz et al., 2011). Desde el punto de vista del huésped, la función principal de la microbiota intestinal es prevenir la colonización de microorganismos patógenos, esto lo hace de manera eficiente al antagonizar con patógenos intestinales como rotavirus, el cual compite con la microbiota intestinal por el sitio-receptor de los enterocitos (Tuohy et al., 2003). Por otro lado, el metabolismo microbiano sirve como una importante fuente de energía para la pared intestinal, proporcionando hasta el 50% de los requerimientos diarios de energía de los enterocitos por fermentación de carbohidratos a ácidos orgánico (Nomoto, 2005). La microbiota intestinal actúa como un modulador importante del sistema inmunológico del huésped, estimulando la primera línea de defensa y la respuesta inmune innata (Holloway et al., 2014). Del mismo modo, los mecanismos de defensa que ofrece una microbiota intestinal saludable pueden verse afectados cuando se ven comprometidos por patógenos gastrointestinales como rotavirus el cual genera una gastroenteritis aguda causando daños considerables en la salud del huésped de no ser tratada a tiempo (Lee et al., 2015). La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes a nivel mundial, representando una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años (Onori et al., 2014). Rotavirus es uno de los principales causantes de esta enfermedad, responsable de aproximadamente 215,000 muertes anuales a nivel mundial (Olivart et al., 2017). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de dos vacunas atenuadas para la infección por rotavirus (Rotarix® y RotaTeq®) las cuales muestran un porcentaje de efectividad del 80 al 95%, a pesar de ello diversos países han desarrollado vacunas con cepas específicas de la región por la falta de protección en esas zonas por estas cepas vacunales (Kirkwood et al., 2011; Sanneh et al., 2018). A pesar de esto, los índices de morbilidad y mortalidad siguen elevados, por lo que es necesario implementar nuevos tratamientos para este tipo de infecciones.

Estudios recientes demuestran que el uso de probióticos reduce o previene la severidad en la infección causada por rotavirus (Park et al., 2017). Los probióticos son microorganismos propios del microbiota intestinal; los cuales confieren un beneficio para la salud del huésped (Kawahara et al., 2017; Delgado et al., 2018). En la actualidad diversos estudios se han enfocado en la implementación de probióticos (*Bifidobacterium longum*, *B. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) para tratar la infección causada rotavirus (Lee et al., 2015). No obstante, estos deben ser administrados en grandes cantidades que permitan la colonización o favorezcan la viabilidad a través del sistema gastrointestinal, debido a que los probióticos pasan por barreras físico-químicas perdiéndose una proporción considerable, lo que disminuye su capacidad de colonización del intestino. Actualmente, estudios demuestran que la implementación sustancias que estimulen o mantengan el crecimiento de los probióticos dentro del organismo (prebióticos) favorecen la colonización y mantenimiento de estos en el tracto gastrointestinal (Delgado et al., 2016). Por tal motivo, en este trabajo se determinó el efecto antiviral de la combinación del probiótico *Bifidobacterium longum* y del prebiótico *Chlorella sorokiniana*, el cual elevó los niveles de expresión INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-3, IRF-5, RIG-1 y SOCS3, estando involucrados en la inmunidad celular contra patógenos virales, y cuyos resultados nos permitieran determinar si los tratamientos a base de *C. sorokiniana* y *B. longum* pueden restablecer la vía de señalización de citocinas durante una infección por rotavirus.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Probióticos y Prebióticos

El término "probiótico" fue inicialmente utilizado como un antónimo de la palabra antibiótico, cuya raíz es de origen griego (pro = vida). En 1965, Lilly y Stilwell utilizaron por primera vez el término probiótico para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro, en contraposición al término antibiótico (Manzano et al., 2012). La Organización Mundial de la Salud define a los probióticos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped". Por este motivo son más aceptados como una alternativa profiláctica para los seres humanos y animales, principalmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales o como tratamientos preventivos (Lauzon et al., 2014; Miller et al., 2017).

Uno de los principales probióticos son las bifidobacterias, las cuales predominan en la microbiota intestinal de lactantes, modulando las infecciones gastrointestinales (Konar et al., 2018). El mecanismo de acción puede variar de una especie a otra, además no siempre colonizan el tracto intestinal al ser ingeridos, ya que algunos probióticos son transitorios, como algunas especies de *Lactobacillus*, contrario a lo que ocurre con *Bifidobacterium longum*, el cual puede colonizar, como parte de la microbiota intestinal humana después de ser ingerido (Gogineni et al., 2013; Plaza-Díaz et al., 2018).

Los probióticos poseen propiedades antagonistas contra patógenos, suprimiendo su crecimiento a través de la producción de compuestos antimicrobianos como defensinas, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH del lumen intestinal. Algunas cepas de probióticos tienen la capacidad de inducir la producción de mucina, la cual es esencial para que estos logren colonizar efectivamente la pared intestinal (Kristensen et al., 2016). Algunos probióticos poseen la capacidad de modular la respuesta inmune celular e incluso tener un efecto antitumoral induciendo citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , o bien por la estimulación de inmunoglobulina A (IgA) y activación de células T reguladoras. De igual forma, su interacción con células epiteliales del huésped al adherirse desencadena una serie de cascadas

que activan algunos mecanismos asociadas a la respuesta inmune (Rodríguez et al., 2017; Delgado et al., 2018; Yıkmiş et al., 2018) (Fig. 1).

La exploración adicional de los probióticos ha llevado al desarrollo de prebióticos, los cuales son nutrientes que modifican la microbiota intestinal, estimulando el crecimiento de especies bacterianas benéficas en el tracto gastrointestinal del huésped (Rastall y Gibson, 2015). La fermentación de carbohidratos representa una fuente importante de energía para los enterocitos y los prebióticos pueden cumplir fácilmente estos requisitos como resultado de su fermentación por la microbiota intestinal, como las bifidobacterias y los lactobacilos (Thomas, 2016).

Los prebióticos se pueden obtener de fuentes naturales como verduras, frutas y granos, los cuales se consumen de manera cotidiana. Estos, no solo sirven como fuente de energía, sino que también tienen varios beneficios para la salud, como la reducción de la prevalencia y la duración de la diarrea, así como la inflamación y otros síntomas asociados a trastornos intestinales, y ejerciendo efectos protectores para prevenir el cáncer de colon (Peña, 2007). Recientemente se ha reportado que mejoran la biodisponibilidad y absorción de minerales, ayudan a disminuir algunos factores de riesgo en enfermedades cardiovasculares, además de promover la saciedad y la pérdida de peso (Pokusaeva et al., 2011). A pesar de sus vastos beneficios nutricionales y medicinales, la investigación sobre la detección de nuevos prebióticos versátiles es escasa. Por lo tanto, las investigaciones deben centrarse en identificar nuevos suplementos para la salud, donde la detección e identificación de prebióticos nuevos sean la preocupación principal.



concentración del 95 % en recién nacidos alimentados con leche materna (Saavedra, 2007; Solano-Aguilar et al., 2008). Estudios recientes han demostrado que la implementación de *B. longum* reduce la duración y gravedad de la diarrea por infecciones virales, así como las reinfecciones mediante la modulación de la respuesta inmune (Uyeno et al., 2015). Aunado a esto, permite el mantenimiento un tracto digestivo sano, inhibiendo el crecimiento de bacterias dañinas, así como la estimulación activa del sistema inmunológico (Pinto-Sanchez et al., 2017). *B. longum* posee múltiples vías catabólicas, lo que le permite utilizar una gran variedad de nutrientes y aumentar su competitividad entre el microbiota intestinal (Yuan et al., 2006). *B. longum* fermenta aminoácidos de cadena larga e hidroliza sales biliares (Pinto-Sanchez et al., 2017; Schell et al., 2002). La composición del microbiota humano varía con la edad, la dieta y la ubicación en el tracto gastrointestinal (Parche et al., 2007).

### **2.3 *Chlorella sorokiniana***

*Chlorella* es un género de microalgas verdes unicelulares, las cuales se utilizan como suplemento alimenticio, consideradas actualmente como un prebiótico (Wan et al., 2011). Esta microalga es de gran interés industrial debido a los múltiples usos que puede darse a su biomasa en la alimentación, debido a que es una fuente rica de carbohidratos, vitaminas y proteínas, y recientemente se ha recomendado en el área de la salud, gracias a su capacidad de inducir apoptosis en células de linfoma murino (Lin et al., 2017; Reyna-Martínez et al., 2018).

El alto contenido proteico la convierte en una materia prima en la industria alimenticia, mientras que su alto contenido en vitaminas en un alimento adecuado en sistemas de acuicultura. Así mismo, es utilizada en la producción de antioxidantes comercialmente importantes como luteína,  $\alpha/\beta$  caroteno,  $\alpha/\beta$  tocoferol, zeaxantina (Safi et al., 2014). En la actualidad existen estudios en los que se evaluó los efectos anti-cancerígenos y vírales de diferentes géneros de *Chlorella*, los cuales han tenido resultados satisfactorios contra estas patologías demostrando la actividad antiviral contra la hepatitis C el cual es un virus envuelto altamente patógeno (Azocar y Diaz, 2013; Lin et al., 2017; Reyna-Martínez et al., 2018).

## 2.4 Gastroenteritis viral

La gastroenteritis viral es responsable de alrededor del 70 % de los casos reportados en niños menores de 5 años (Lee et al., 2015). En la actualidad existen más de 20 tipos de virus causantes de gastroenteritis, del cual rotavirus es uno de los virus de mayor prevalencia a nivel mundial, identificándose en aproximadamente el 50 % de los casos reportados, (Chaimongkol et al., 2012; Wilson et al., 2018). La gastroenteritis ocasionada por rotavirus puede manifestarse tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Esta patología es considerada una enfermedad de la infancia fácilmente manejable cuando es tratada a tiempo; sin embargo, más de 215,000 niños menores de 5 años mueren anualmente a causa de esta enfermedad (Crawford et al., 2017; Rogawski et al., 2018).

Actualmente, los países en vía de desarrollo presentan una cifra alta de morbilidad y mortalidad en comparación con los países desarrollados (Rosettie et al., 2018). La etapa temprana de la enfermedad tiene un periodo de incubación del virus de 1 a 2 días, caracterizándose por provocar una sintomatología de vómito, diarrea acuosa de 4 a 7 días de duración, dolor abdominal, fiebre y diversos grados de deshidratación (Andersson et al., 2017). El tratamiento se basa principalmente en rehidratación oral y, en casos más graves, rehidratación vía intravenosa (Lee et al., 2015). En la actualidad, se encuentran en circulación dos vacunas para la prevención de la gastroenteritis por rotavirus (Rotarix® y RotaTeq®) las cuales cuentan con un porcentaje de efectividad del 95 % (Kirkwood et al., 2011). Sin embargo, los índices de morbilidad y mortalidad siguen estando elevados a nivel mundial debido a su alta incidencia (Sanneh et al., 2018).

## 2.5 Características de Rotavirus

Rotavirus es miembro de la familia *Reoviridae*, se caracteriza por no presentar envoltura lipídica y tener una simetría icosaédrica. Su genoma viral consta de 11 segmentos de ARN bicatenario que codifican seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP5/NSP6) (Ramani et al., 2016). Las partículas virales presentan un tamaño aproximado de 70-100 nm de diámetro y poseen una cápside de proteína triple compuesta de una capa externa, una capa intermedia y una capa de núcleo interno (Sen et al., 2017). Rotavirus se clasifica en ocho grupos (A a H) de los cuales el A, B y C se

encuentran tanto en humanos como en animales, mientras que D, E, F, G y H a la fecha solo se han encontrado en animales (Matthijnssens et al., 2012). A su vez los Rotavirus tipo A se subclasifican en serotipos y genotipos en base a los distintos tipos de proteínas estructurales presentes en la cápside externa VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P) (Rosettie et al., 2018). La mayoría de las cepas de rotavirus humanos tipo A asociados a gastroenteritis aguda son los genotipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8], de los cuales se desglosan genotipos emergentes como G9 y G12P[8] (Crawford et al., 2017; González et al., 2017).

## **2.6 Estrategias de evasión viral de virus entéricos**

Los interferones (INF) son las citocinas clave del huésped en la respuesta inmune innata ante una infección viral, los INF tipo III son críticos en el control localizado de las infecciones gastrointestinales en los sitios de la barrera de la mucosa intestinal, mientras que los INF tipo I son importantes para un amplio control sistémico de las infecciones (Ingle et al., 2018). Los virus cuentan con diferentes mecanismos de evasión del sistema inmune del huésped, mediante proteínas no estructurales denominadas anti-interferón. Estas bloquean diferentes vías de señalización del sistema inmune innato intracelularmente, evitando la detección del material genético viral como extraño, además de inhibir la proliferación de citocinas encargadas de mantener en estado antiviral a la célula huésped como la familia de los INFs de tipo I y III (Beachboard y Horner, 2016). Rotavirus, mediante la proteína NSP1 inhibe cascadas de señalización de diversas citocinas, para así poder evadir la respuesta antiviral generada por la célula huésped. Estas proteínas conducen a la degradación de receptores de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$  y INF- $\gamma$ , *in vitro* e *in vivo* en células infectadas (Morelli et al., 2015; Sen et al., 2017). La proteína NSP1 de rotavirus está estrechamente involucrada en la degradación de los factores de transcripción IRF-3, IRF-5 e IRF-7, así como otras moléculas importantes en la cascada de señalización de la respuesta inmune innata, como el factor 2 asociado al factor de necrosis tisular (TRAF2), RIG-I y MAVS (Bagchi et al., 2013; Nandi et al., 2015). La proteína NSP1 también inhibe las respuestas de INF y la producción de ISG al inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, fundamental para inducir la transcripción de INF- $\beta$  e IFN- $\lambda$ , y prevenir la fosforilación mediada por interferón y la translocación nuclear de STAT1 *in vitro*. Los rotavirus cuentan con efectores para

contrarrestar la respuesta antiviral del huésped (Zhang et al., 2013; Holloway et al., 2014; Sánchez-Tacuba et al., 2015).

Estudios recientes, se han enfocado en demostrar como los virus entéricos evaden la respuesta antiviral de la célula huésped, demostrando la presencia y acción de diversas proteínas virales, tales como la proteína MNoV VF1 de Norovirus, la cual se localiza en las mitocondrias y bloquea la expresión de INF- $\beta$ , Cxcl10 e Ifit2 (McFadden et al., 2011). Además, esta proteína se asocia con la virulencia del virus, en la cual Zhu y colaboradores (2013) demostraron que la proteína VF1 de una cepa atenuada naturalmente MNV-3 no inhibe la activación del promotor INF- $\beta$ , mientras que VF1 de una cepa virulenta MNV-1 bloquea la actividad del promotor INF- $\beta$  (Zhu et al., 2013). Gran número de patógenos inhiben las vías de señalización del sistema inmunológico, evitando la respuesta de INFs, los cuales son encargados de mantener a la célula huésped en un estado antiviral (Ingle et al., 2018).

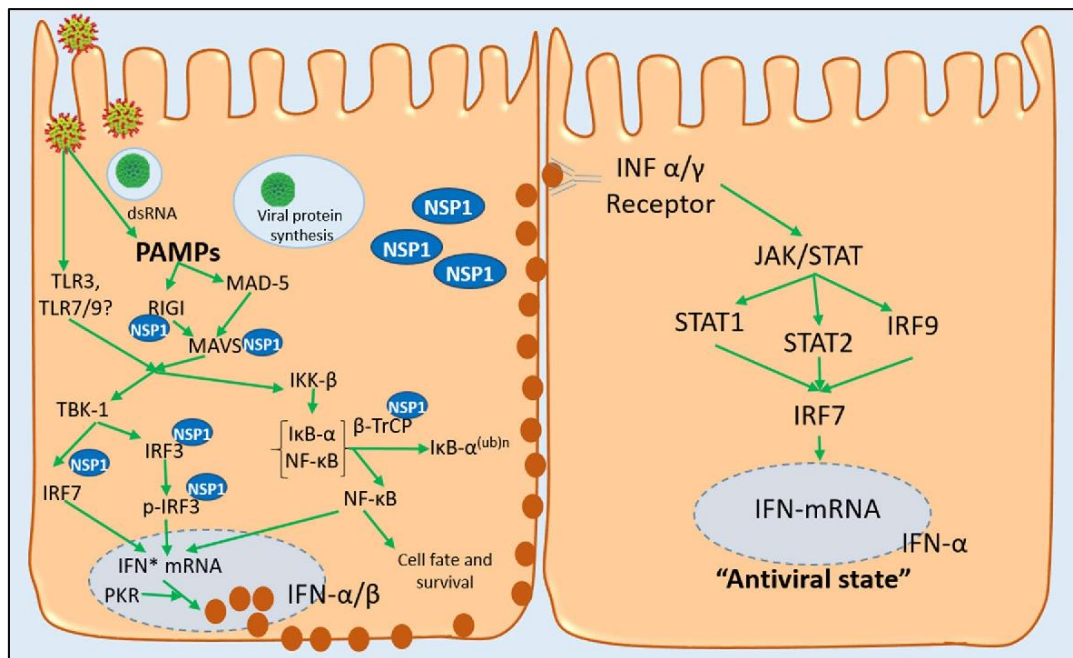
## **2.7 Respuesta inmune innata y características antigénicas**

Las células T pueden mediar el efecto contra la infección del virus en ausencia de perforina, Fas e INF- $\gamma$ . Aparentemente, las células T pueden eliminar la infección más rápido y eficiente que las células B, esto debido a que las células T actúan directamente en la respuesta inmune innata y las B en la específica. Las células T CD8<sup>+</sup> pueden mediar la infección primaria del virus y brindar la protección casi completa o parcial de la reinfección (Estes y Greenberg, 2013).

Los Rotavirus han desarrollado múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune innata, particularmente la respuesta de interferón tipo I (Holloway et al., 2014). Se ha caracterizado a la proteína NSP1 como un inhibidor de la producción INFs al inducir la degradación de los factores reguladores de IRF3, IRF5 e IRF7, en un proceso dependiente de la célula hospedadora (Fig. 2) (Arnold et al., 2011; Crawford et al., 2017). Debido a la pérdida de IRF3, se suprime la expresión de IFN- $\beta$  y hay degradación de IRF5, la cual se asocia a la regulación negativa de la activación de genes que producen citocinas proinflamatorias. Finalmente, la degradación de IRF7 está relacionada con la expresión disminuida de IFN tipo I y con la activación del gen de IFN- $\alpha$  (Barro y Patton, 2007). NSP1 también interviene en la

degradación de  $\beta$ -TrCP y la inhibición de la activación de NF $\kappa$ B (Morelli et al., 2015; Rogawski et al., 2018).

Todos estos efectos dependen de la cepa de rotavirus y del tipo de célula. Por ejemplo, la NSP1 de algunas cepas animales degrada IRF3, IRF5 e IRF7; sin embargo, NSP1 de rotavirus humano solo degrada IRF5 e IRF7, lo que puede resultar en una inhibición menos eficiente de la respuesta de interferones (Holloway et al., 2018). NSP1 también se ha asociado con la degradación de otras proteínas tales como el receptor de reconocimiento de patrones (receptor citosólico) conocido como gen I inducible por ácido retinóico (RIG-I); El factor 2 está asociado a TNF (TRAF2) y la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS, también conocida como IPS-1, VISA y Cardif). Estos datos indican que NSP1 puede bloquear la señalización inmune innata tanto a nivel transcripcional (IRF, NF- $\kappa$ B) como a nivel de reconocimiento de patrón (PRR), pero no a través de la vía TLR3/TRIF o PKR (Gonzalez et al., 2017). Por otro lado, el virus activa la vía PI3K/Akt para prevenir la apoptosis prematura, y se le relaciona con la depleción postranscripcional de p53, posiblemente a través de la actividad NSP1; como resultado, se previene la apoptosis celular temprana (Mukherjee et al., 2018).



**Figura 2.** Interacción de rotavirus en el sistema innato del huésped (tomado de González et al., 2017).



## **2.8 Respuesta inmune inducida por Rotavirus**

Los mecanismos responsables de la inmunidad del rotavirus humano no se comprenden completamente, sin embargo, parece claro que los factores inmunológicos son cruciales en la susceptibilidad y diseminación sistémica en la infección por rotavirus (Gómez et al., 2019). El virus infecta principalmente a los enterocitos, dentro de los cuales el virus es reconocido mediante receptores citoplasmáticos (RIG-1 y MDA5), los cuales reconocen el ARN viral induciendo respuestas de INF de tipo I y tipo III en la célula huésped (Broquet et al., 2011). Una vez encontrándose intracelularmente, el virus neutraliza y toma el control la producción de INFs en la célula huésped (Lin et al., 2016). La proteína NSP1 de rotavirus regula la baja expresión de INF, lo cual induce la degradación de múltiples miembros de la familia de receptores reguladores de INF, los cuales podrían ser la base de la respuesta inmune innata en la infección natural (Holloway et al., 2014). Otro receptor de reconocimiento de patrones es el TLR3, el cual, evaluado recientemente en modelos animales, se asocia a la resistencia de la enfermedad, pero es dependiente de la edad, debido a que ambos receptores se expresan a niveles altos en animales adultos (Zhu et al., 2017).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La ingesta de probióticos y prebióticos ha sido cada vez más utilizada para tratar diferentes enfermedades relacionadas al tracto gastrointestinal, estos pueden mejorar la colonización intestinal y regular la respuesta inmune del huésped. Una de las principales enfermedades que afectan a niños menores de 5 años es la gastroenteritis, la cual es provocada por diferentes patógenos, principalmente de etiología viral de los cuales predomina rotavirus. La diarrea es uno de los principales síntomas de gastroenteritis por rotavirus en niños y adultos, la cual de no tratarse de forma oportuna o adecuada puede causar la muerte principalmente en menores de 5 años. Uno de los factores de patogénesis de los virus entéricos son las proteínas anti-interferón, las cuales se asocian con la evasión de la respuesta inmune al inducir la degradación de diversas citocinas encargadas de la inmunidad celular. En la actualidad, las vacunas representan la mejor opción en la prevención de la gastroenteritis ocasionada por rotavirus. Sin embargo, estas no le confieren al huésped protección en su totalidad. Por su parte, la ingestión de probióticos como lactobacilos y bifidobacterias se ha relacionado con la prevención y modulación de la severidad de la gastroenteritis. En este aspecto, durante la infección por rotavirus se ha observado que la ingestión de probióticos puede reducir los días con diarrea, progenie viral y favorecer la repuesta inmunológica. Dada la presencia de proteínas virales encargadas en la evasión del sistema inmune del huésped, se ve la necesidad de identificar alternativas eficientes para contrarrestar este efecto; por lo tanto, se propuso estudiar el efecto antiviral del uso combinado de probióticos y prebióticos (*B. longum* y *C. sorokiniana*) en un modelo de infección de un virus enteropatógeno, y determinar si la combinación de ambos podría estar implicada en la disminución o bloqueo de una infección gastrointestinal.

#### **4. HIPOTESÍS**

*B. longum* y *C. sorokiniana* incrementan la respuesta antiviral de tipo celular en un modelo de infección *in vitro*.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de *B. longum* y *C. sorokiniana* en la respuesta antiviral de tipo celular en un modelo de infección *in vitro*.

### **5.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto *B. longum* y *C. Sorokiniana* en células HT-29 en los niveles de expresión de los precursores de interferón.
2. Evaluar el efecto de *Rotavirus wa* en células HT-29 sobre los niveles de expresión de los precursores de interferón.
3. Evaluar el efecto de la combinación de *B. longum* y *C. sorokiniana* en células HT-29 en combinación con rotavirus sobre los niveles de expresión de los precursores de interferón.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Origen de las cepas bacterianas y virales

La cepa de *B. longum* (ATTC: 15707) fue proporcionada por el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. La cepa de la microalga *C. sorokiniana* fue aislada del río San Juan Cadereyta del estado de Nuevo León (Reyna-Martínez et al. 2018), y forma parte de la Unidad de Formulación de Biológicos-LIV-DEMI.

La cepa de *Rotavirus wa* y la línea celular MA-104 fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Sonora. Esta fue la cepa de referencia utilizada en este estudio.

Esta cepa se propagó en células epiteliales de riñón de mono Rhesus (células MA-104) como a continuación se describe. A 500  $\mu$ L del lisado de células MA-104 infectadas con *Rotavirus wa* se le adicionaron 4  $\mu$ L de tripsina al 0.25 % (*Trypsin-EDTA solution 10X* de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se homogenizó por pipeteo y se incubó a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> por 30 min. La monocapa confluyente de células HT-29 se lavó por duplicado con ácido etilen-diamino-tetraacético 0.68 mM (EDTA) y se puso en contacto con el lisado previamente tripsinizado; se incubó por 1 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 4.5 mL de medio RPMI 1640 sin suero, incubándose nuevamente, hasta observar el efecto citopático (24 h). El lisado infectado se retiró de incubación y se congeló; posteriormente, se descongeló/congeló 3 veces en intervalos de 30 y 15 min respectivamente, para almacenar el lisado a -20 °C hasta su uso.

### 6.2 Cultivo de células HT-29

El cultivo de células tumorales humanas derivadas de adenocarcinoma de colon, línea celular HT-29, se realizó en frascos de 25 cm<sup>2</sup> y cuando la monocapa estaba confluyente, se realizó el subcultivo. En una campana de flujo laminar vertical previamente desinfectada, se retiró con una pipeta desechable de 5 mL el medio de cultivo. Posteriormente, se adicionó al frasco de cultivo, 2.5 mL de una solución de EDTA 0.68 mM para lavar las células. La solución de EDTA se retiró con una pipeta de 5 mL y se adicionaron 500  $\mu$ L de tripsina al 0.25 %. Las células fueron monitoreadas en un microscopio invertido (Primovert marca ZEISS), hasta

que éstas presentaran una forma redondeada. Las células fueron desprendidas del frasco y la tripsina fue inactivada adicionando 2.5 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB). Las células se homogenizaron varias veces con una pipeta serológica para evitar la formación de aglomerados. Posteriormente, se pasaron 400  $\mu$ L de las células (aprox. 600,000 células) a un nuevo frasco de cultivo de F25 cm<sup>2</sup> previamente etiquetado con el nombre de línea celular y el número de pase, el cual contenía 4.5 mL de medio RPMI 1640-SFB 10 % suplementado con antibiótico-antimicótico al 1X. Con movimientos suaves se distribuyeron las células en toda la superficie del frasco y se incubaron a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> por 4 días.

### **6.3 Condiciones de crecimiento de *C. sorokiniana***

La microalga *C. sorokiniana* se mantuvo en solución LC (Anexo I) (López et al., 2010) a 4 °C y se realizaron pases cada 30 días, para su conservación. Para la reactivación de la microalga, se tomó un inóculo de 10% y se transferirá a un matraz de 125 mL con un volumen de 50 mL de solución LC, el cultivo se mantuvo en fotoperiodo de 18:6 h luz/oscuridad aproximadamente 10 días con agitación constante a 120 rpm en un agitador orbital (Orbit 1900 de Labnet). El inóculo de *C. sorokiniana* utilizado en los ensayos se ajustó a una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de un stock de *C. sorokiniana* en un matraz de 1000 mL con un volumen final de 500 mL de solución LC, este se incubó por 8 días, con agitación constante a 120 rpm y un fotoperiodo de 18:6 h (luz/oscuridad) a temperatura ambiente (25 °C  $\pm$  1), esto con el fin de obtener mayor cantidad de inóculo el cual fue utilizado a nivel fotobiorreactor.

La producción a nivel de fotobiorreactor se realizó ajustando un inóculo a  $1 \times 10^6$  UFC/mL en un volumen final de 10 L; las condiciones de operación fueron: temperatura de 25 °C  $\pm$  1, agitación a 120 rpm/min, fotoperiodo de 18:6 h, utilizando 3 lámparas fluorescentes de 1449 lúmenes cada una, en aireación constante de 2.5 L/min. Para monitorear la densidad celular y determinar la fase estacionaria del cultivo se llevó a cabo un recuento celular mediante la toma de una muestra de 10 mL cada 24 h, a la cual se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  y posteriormente se realizó un conteo de la microalga, mediante una cámara de Neubauer para contar tales colonias, tomándose un nivel de precisión de acuerdo con la fórmula  $X \pm 0.10$ , lo cual da un margen de error del 10 %, siendo permisible para estos fines.

Una vez que el cultivo alcanzó su fase estacionaria, se detuvo la producción y se procedió a la cosecha de *C. sorokiniana*. Para esto, el cultivo se sometió a un proceso de refrigeración a 4°C por 3 d; entonces se agregó NaOH al 1N y se homogenizó hasta que se observaron cúmulos de celulares, indicando que llegó el cultivo a su máximo crecimiento. Después se decantó cuidadosamente el sobrenadante obteniendo el pellet, el cual se recolectó en tubos de 50 mL. Por último, se realizó dos lavados a los sedimentos celulares, re-suspendiéndolos en solución salina al 0.85 % y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min.

También se determinó el rendimiento de la producción de biomasa. Para lograrlo se centrifugaron 10 L de cultivo de *C. sorokiniana* a 8000 rpm/15 min y posteriormente los pellets se liofilizaron y pesaron.

#### **6.4 Producción y Cinética de Crecimiento de *B. longum***

La cepa de *B. longum* se reactivó en dos ocasiones para asegurar su actividad, a partir de un cultivo que se mantuvo en refrigeración a 4°C en agar semisólido MPT, el cual se preparó de acuerdo con las indicaciones mencionadas por Barrón et al. (2008). La cepa se activó tomando 500 µL del cultivo y se resuspendió en 5 mL de caldo MPT, después se incubará por 18 h a 37 °C. Esto se realizó dos veces, pero esta vez utilizando un inóculo al 1 %. Posteriormente, se transfirieron 50 µL de cultivo a tubos de borosilicato de 13X100 mm con 5 mL de caldo MPT y se guardaron a 4 °C por un periodo máximo de tres meses.

La cinética de crecimiento se realizó por el método turbidimétrico. Para ello se inocularon 50 µL del cultivo nuevo en caldo MPT (24 h) en un tubo de 3X100 mm con 5 mL del mismo medio, en una serie de tres repeticiones. El cultivo se incubó a 37 °C y a partir de cada hora se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 635-nm, hasta que se observó que el cultivo entrara en fase estacionaria. Los resultados de las absorbancias se registraron y se representaron mediante una gráfica.

Una vez identificada la fase exponencial se produjo biomasa de la cepa probiótica, considerando la metodología de la cinética y un tiempo 18 h de producción continua, se tomó una alícuota de 1 mL de muestra para el recuento inicial de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). La alícuota se suspendió en 9 mL de solución salina al 0.85 % y se realizaron diluciones seriadas de  $10^2$ - $10^{14}$ . A partir de cada una de las diluciones de un rango de  $10^9$ - $10^{14}$  se tomó 1 mL de muestra y se transfirió a una caja Petri (por triplicado). Después

se agregaron aproximadamente 15 mL de agar MTP (a una temperatura de entre 35-45 °C) e inmediatamente se realizaron 8 movimientos en forma de 8 para obtener un óptimo homogenizado de la muestra; una vez solidificado el agar en las cajas Petri, se dejó incubar a 37 °C por 24 h. Al finalizar el período de incubación se procedió a contar las colonias en las cajas de Petri. Una vez obtenidos los resultados, se procedió a ajustar el inóculo de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, para evaluarse en los bioensayos.

### **6.5 Propagación de *Rotavirus wa* en células MA-104**

Se tomó 1 mL de lisado de *Rotavirus wa* y se añadió 10 µL de tripsina 1X (Tripsin EDTA solution 10X, Sigma-Aldrich), se homogenizó y se puso a incubar (para su activación) a 37°C durante 30 min. La monocapa confluyente de células MA-104 fueron lavadas dos veces con PBS 1X y se añadió el virus previamente tripsinizado, se incubó durante 60 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, después se agregaron 50 mL de medio de crecimiento sin suero fetal bovino (SFB) para incubarse nuevamente hasta observar efecto citopático o lisado completo de la monocapa (24-48 horas), se retiró de incubación el frasco F75 y se congelo y descongelo por 3 ocasiones, finalmente el lisado se alicuotó y almacenó a -20 °C hasta su uso. La presencia de *Rotavirus wa* en los lisados de células se identificó mediante SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline, CTR, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.)

### **6.6 Microtitulación de focos infecciosos**

El lisado fue titulado de la siguiente manera: 350 µL del lisado se activó con 3.5 µL de tripsina al 1X y se incubó a 37 °C a 5 % de CO<sub>2</sub> por 30 min. Posteriormente, del lisado tripsinizado se prepararon diluciones seriadas 1:2 (100 µL de lisado se diluyó en 100 µL de Medio de mantenimiento RPMI sin SFB), la dilución fue homogenizada y a partir de ahí se prepararon las siguientes diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Por otro lado, en una placa de 96 pozos la monocapa confluyente de células MA-104 fue lavada por duplicado con PBS 1X. A cada pocillo se le adicionó 50 µL de lisado para cada una de las diluciones preparadas y se incubó por 1 h a 37 °C. El inóculo fue retirado, la monocapa fue lavada con 200 µL de PBS 1X y se adicionaron 150 µL de medio de mantenimiento a cada pocillo; posteriormente, la placa se incubó por 12- 14 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se retiró el medio



de cultivo, se lavó la monocapa con PBS 1X y se fijó con 100 µL de una solución de acetona al 80 % en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 75 µL de anticuerpo anti-rotavirus diluido 1:3,000 por 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X, se les adicionó 75 µL de anticuerpo anti-IgG peroxidasa (diluido 1:900) y se incubó por 1 h a 37 °C. Se lavó la monocapa y se incubó por 10 min a 37°C con 75 µL de sustrato (4 mL de buffer acetatos 0.05M pH 5, 10 µL de peróxido de hidrogeno al 30 % y 1.5 mL de Carbazol 4 mg/mL), después de lo cual, la reacción conjugado-sustrato se detuvo al retirar la reacción y sumergir las células en agua 4 veces. El conteo de focos infecciosos teñidos con inmunoperoxidasa se realizó en el microscopio invertido utilizando el objetivo 20 X, el cálculo de las unidades formadoras de focos infecciosos por mL (UFF/mL) se determinó en base a la siguiente fórmula:

$$\text{UFF/mL} = (\text{No. de focos}) (\text{Objetivo}) (\text{diámetro*}) (\text{dilución**})$$

\* Diámetro del pocillo en donde se realiza en conteo, el pocillo de una placa de 96 pozos es de 5.5 mm.

\*\* La dilución en donde la cuenta de focos infecciosos es  $\leq 200$  focos

## 6.7 Multiplicidad de infección

Este se refiere a la cantidad de virus inoculado por célula del cultivo celular. La multiplicidad de infección (MOI) fue utilizada para estandarizar la cantidad de virus a utilizar en las infecciones celulares posteriores, la dosis infecciosa óptima fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{MOI} = (\text{UFF/mL}) / (\# \text{ células})$$

NOTA: El número de células dependerá del área de cultivo que se va a infectar e indica la cantidad teórica de células totales presentes en la monocapa.

## 6.8 Ensayo de viabilidad celular mediante el método del MTT

Para cumplir con el objetivo 1, que es el de determinar el efecto *B. longum* y *C. sorokiniana* en células HT-29 en los niveles de expresión de los precursores de interferón, se seleccionó el ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT, que tiene un color amarillo pálido en solución, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. De dicha reducción metabólica se genera un compuesto de color azul (sales de formazán), lo que permite visualizar por el cambio de color, la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y por tanto su viabilidad (Mosmann et al., 1983), ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de sales de formazán producido.

Para el ensayo MTT se realizó un subcultivo de células HT-29 en una placa de 96 pozos, donde se colocó una concentración de  $10^4$  células por pozo en un volumen final de 200  $\mu$ L con medio RPMI 1640 y se incubó por 24 h a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>. Una vez transcurridas las 24 h, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con solución salina; posteriormente, se agregó un volumen final 200  $\mu$ L a cada pozo a diferentes concentraciones de *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^6$ ) adicionado con medio RPMI 1640 sin SFB. Se dejó incubando 12 h a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con solución salina; se agregaron 20  $\mu$ L de MTT a 5 mg/mL a cada pozo y se dejó incubar por 3 h. Se retiró el MTT y se agregó 100  $\mu$ L de DMSO por pozo hasta disolver los cristales de formazán a temperatura ambiente; se dejó incubando en agitación 5 min y se leyeron las densidades ópticas en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific), a una longitud de onda de 570 nm (Gomez-Flores et al., 2005).

## 6.9 Tratamientos

Para preparar los tratamientos, se tomaron 5 mL de un stock concentrado de *C. sorokiniana*, los cuales se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se realizaron tres lavados seguidos con PBS 1X, centrifugando durante 10 min a 5000 rpm, descartando siempre el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron en 5 mL de solución salina suplementado con antibiótico-antimicótico 1X (Gigco) y, se incubó a 37 °C durante 24 h previo al uso del tratamiento. Una vez transcurrida la incubación con el antibiótico, se contaron las células de *C. sorokiniana*

en cámara de Neubauer y su número se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL, para su empleo en los tratamientos.

Para la evaluación de los tratamientos, se sembraron células HT-29 en placas de 6 pozos, a una concentración de 100,000 células por pozo a un volumen final de 2 mL y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia del 90 % (2,500,000 células).

Para el conteo de *B. longum* se usó como referencia la concentración de  $3 \times 10^8$  UFC en una densidad óptica de 0.257 (Del et al., 2017). A partir de aquí se procedió a ajustar la concentración a  $1 \times 10^6$  UFC del cultivo de *B. longum* en fase exponencial (12 h).

### **6.9.1 Tratamiento control**

Para cumplir con este objetivo, se agregó *C. sorokiniana* y *B. longum* (individual y en combinación) a la línea celular HT-29 sin infectar (interacción célula/célula) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC. Los tratamientos se ajustaron a su concentración con medio RPMI sin SFB. Las células se lavaron con PBS 1 X por duplicado antes de ser sometidas a tratamiento; posteriormente, se adicionaron los tratamientos en un volumen de 2 mL por pozo; como control (MOCK) se utilizaron células sin tratamiento. Cada tratamiento se incubó a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h, y se procedió a realizar la extracción de ARN total. Este experimento se realizó por triplicado.

### **6.9.2 Tratamientos Pre-Infección**

Los tratamientos se prepararon y se colocaron en un volumen de 2 mL por pozo, estos fueron incubados a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 h; una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tratamientos fueron retirados, seguidos de un lavado con 2 mL de PBS 1X. Posteriormente, las células se infectaron con el *Rotavirus wa* con un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 0.1, siguiendo el protocolo mencionado en el punto 6.5. Como MOCK se usaron células HT-29 infectadas sin tratamiento y sin infectar. Las células se incubaron 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h y se procedió a realizar la extracción de ARN total; este experimento se realizó por triplicado.

### **6.9.3 Tratamientos Post-Infección**

Aquí se siguió el procedimiento inicial descrito en el punto 6.8.2, con la diferencia de que los tratamientos se aplicaron después del proceso de infección con el *Rotavirus wa*. Los tratamientos se prepararon y se colocaron en un volumen de 2 mL por pozo y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Posterior a esto se realizó la extracción de ARN total mediante trizol. Este experimento se realizó por triplicado.

### **6.10 Evaluación del Efecto Citopático**

La evaluación del efecto citopático se llevó a cabo a la par con los tratamientos mediante evaluaciones fotográficas y desprendimiento parcial de la monocapa a las 1, 12 y 24 h posteriores a la aplicación del tratamiento. Los porcentajes de inhibición del efecto citopático se calcularon en base a el promedio de 10 campos (40 X) bajo el uso del microscopio confocal (Primovert, Heizz), en los cuales se evaluó el desprendimiento de la monocapa celular.

### **6.11 Extracción de ARN total**

La extracción de ARN total de todos los tratamientos utilizados se realizó bajo el método de TRIZOL. Para la extracción de ARN total se partió de placas de 6 Pozos (Nest Biotechnology) donde se realizaron los tratamientos. Antes de empezar, se realizó 1 lavado con 1 mL de PBS 1X. Para cada pozo se usaron 500 µL de TRIZOL, se homogenizó mediante pipeteo hasta observar el desprendimiento total del monocapa celular. Con la misma micropipeta se colocó la mezcla en un tubo de 1.5 mL y se incubó en hielo por 5 min, después se adicionaron 100 µL de cloroformo, se homogenizó nuevamente y se incubó en hielo por 3 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 15 min, se retiró cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, al cual se le adicionaron 400 µL de isopropanol; la mezcla se homogenizó por inversión, para incubarse a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover la pastilla de ARN, se adicionó 1 mL de etanol absoluto, se

homogenizó por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 7 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75%; nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C, se retiró todo el sobrenadante y se colocó en la campana de flujo laminar por 15 min para secar la pastilla de ARN. El ARN obtenido se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril, se cuantificó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

## 6.12 Síntesis de ADNc

El ARN total de las células tratadas se sometió a una transcripción inversa con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) El protocolo de la reacción se usó a un volumen final de 20 µL. En tubos de microcentrífuga de 0.2 mL se mezcló 2 µL de 10X RT buffer, 0.8 µL de 25X dNTPs mix, 2 µL de RT random primer, 1 µL de la enzima (Multiscribe reverse), 4.2 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de ARN total a una concentración de 2,000 ng/µL. Los tubos se colocaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 37 °C por 60 min, 85 °C por 5 min y finalmente 4 °C como extensión final. Al término de la reacción, los productos de RT-PCR se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

## 6.13 Análisis de expresión de genes

Se analizó la expresión relativa de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-3, IRF-5, RIG-1 y SOCS3 en células HT-29 tratadas, mediante la técnica de PCR en tiempo real, en el cual se utilizó como gen endógeno a la enzima glucolítica fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1), con base en los objetivos específicos:

- Células HT-29 tratadas con *B. longum* y *C. sorokiniana*.
- Células HT-29 infectadas por *Rotavirus wa*
- Células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* y tratadas con *B. longum* y *C. sorokiniana*.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL, usando el Kit Sensi FAST SYBER Lo-ROX (Bioline), bajo las siguientes indicaciones: 5 µL de SYBR Master 2x, 1 µL de cada oligonucleótido (1 µM) (Tabla 1), 1 µL de ADNc (50 ng) y 2 µL de agua Milli-Q.

Los oligonucleótidos utilizados fueron probados en una PCR punto final utilizando como molde ADNc de células HT-29 sin infectar y sin tratar.

**Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos empleados como cebadores.**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>
<i>INF-<math>\alpha</math> Fwd</i>	5'-TTT CTC CTG CCT GAA GGA CAG-3'	373
<i>INF-<math>\alpha</math> Rvs</i>	5'-TCC ATG ATT TCT GCT CTG ACA-3'	
<i>INF-<math>\beta</math> Fwd</i>	5'-CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG-3'	409
<i>INF-<math>\beta</math> Rvs</i>	5'-GCA AAC TGC TCA CGA ATT TTC C-3'	
<i>IRF-3 Fwd</i>	5'-ACC AGC CGT GGA CCA AGA G-3'	65
<i>IRF-3 Rvs</i>	5'-TAC CAA GGC CCT GAG GCA C-3'	
<i>IRF-5 Fwd</i>	5'-CTG TCT CTG GTC TGG TCA GC-3'	564
<i>IRF-5 Rvs</i>	5'-GCC AGC CAG GTG AGT GTT TA-3'	
<i>RIG1 Fwd</i>	5'-CTC CCG GCA CAG AAG TGT-3'	170
<i>RIG1 Rvs</i>	5'-CCT CTG CCT CTG GTT TGG-3'	
<i>SOCS3 Fwd</i>	5'-ACA ATC TGC CTC AAT CAC TCT G-3'	129
<i>SOCS3 Rvs</i>	5'-TTG ACT TGG ATT GGG ATT TTG-3'	
<i>PGK1 Fwd</i>	5'-GAG ATG ATT ATT GGT GGT GGA A-3'	
<i>PGK1 Rvs</i>	5'-AGT CAA CAG GCA AGG TAA TC-3'	

Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, 45 ciclos a 58 °C por 5 s 60 °C por 10 s. La relación de la expresión de cada gen se calculará mediante la función 2- $\Delta\Delta$ Ct (PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Forster City, CA.). Cabe mencionar que los cebadores utilizados fueron evaluados antes con una PCR convencional.

#### 6.14 Método de determinación de expresión relativa

Se seleccionó el método delta-delta (2- $\Delta\Delta$ Ct), pues la cuantificación del ADN se realiza con base en una ecuación presentada por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer de México, Monterrey, N.L.). Se trata de un modelo matemático para comparar resultados de expresión relativa de ADN entre tratamientos, en PCR en tiempo real, cuya ecuación puede ser expresada de la siguiente manera:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-[\Delta\text{Ct muestra células infectadas} - \Delta\text{Ct muestra células no infectadas}]}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Dónde:

- $\Delta\text{Ct muestra células infectada} = \text{Ct gen de interés} - \text{Ct gen normalizador}$ , obtenidos de la amplificación en la muestra experimental.
- $\Delta\text{Ct muestra células no infectadas} = \text{Ct gen de interés} - \text{Ct gen normalizador}$ , obtenidos de la amplificación en la muestra no infectada.

La eficiencia de amplificación en tiempo real, tanto del gen de interés como del gen de referencia, con un valor  $E = 2$ , es la condición óptima sobre todo cuando son idénticas entre sí. La cuantificación relativa siempre está basada en un transcrito de referencia. Los rangos de expresión considerados como significantes se encuentran en los rangos  $>1.5$  veces o  $< 0.67$  veces, o bien, en un rango de 1.5 a -1.5 veces de cambio en la expresión.

### 6.15 Análisis estadístico

Los resultados de expresión relativa de los tratamientos se sometieron al análisis de varianza de un factor utilizando una prueba t para muestras independientes y posteriormente se aplicó una prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar los grupos diferentes, debido a la naturaleza de los datos. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (IBM SPSS Statistical control software 20: <https://www.ibm.com/mx-es/marketplace/spss-statistics/purchase>, estableciendo la significación estadística de  $P \leq 0.05$ .

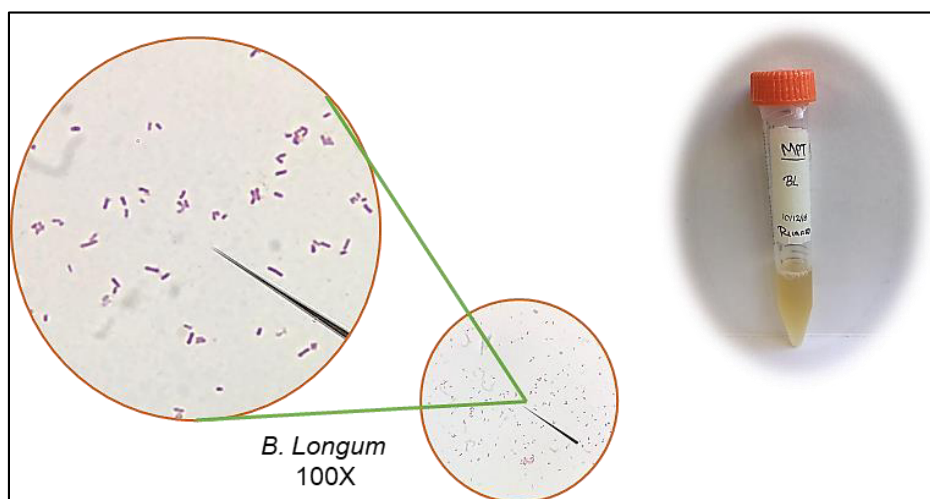
## 7 RESULTADOS

Este estudio se enfocó en identificar el efecto antiviral que se genera en la implementación de la combinación de probióticos y prebióticos ante una infección por *Rotavirus wa*. El objetivo fue evaluar el efecto de *B. longum* y *C. sorokiniana* en la respuesta antiviral de tipo celular en un modelo de infección *in vitro*. Para lograr este objetivo se emplearon la cepa de *B. longum* del laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, la cepa de *C. sorokiniana* y la línea celular HT29 de la Unidad de Formulación de Biológicos-LIV-DEMI de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y la cepa de *Rotavirus wa* del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Sonora.

### 7.1 Propagación de cepas

#### 7.1.1 Análisis de *Bifidobacterium longum*

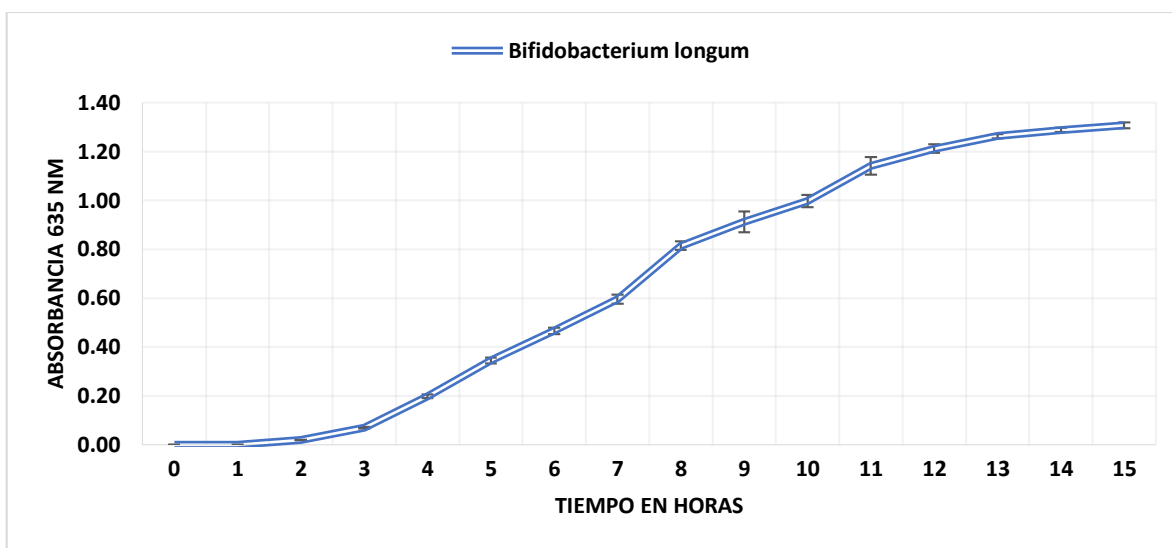
Cultivos puros de la cepa de *B. longum* se descongelaron y fueron cultivados en medio MPT y posteriormente analizados por tinción Gram para verificar que no tuviera alguna contaminación, identificándose bacilos en forma de “Y” griega Gram positivos característicos de este microorganismo (Fig. 3).



**Figura 3.** Tinción Gram a partir del cultivo descongelado de *B. longum* en medio MPT.



Posteriormente se realizó una curva de cultivo para establecer la cinética de crecimiento de *B. longum* (Fig. 4) identificándose la fase de latencia en tres horas, mientras que la fase exponencial se presenta aproximadamente entre las 3-12 h. Finalmente se observó una lenta proliferación, indicando el comienzo de la fase estacionaria. Esto con la finalidad de seleccionar el tiempo ideal de crecimiento *B. longum* en los tratamientos empleados.

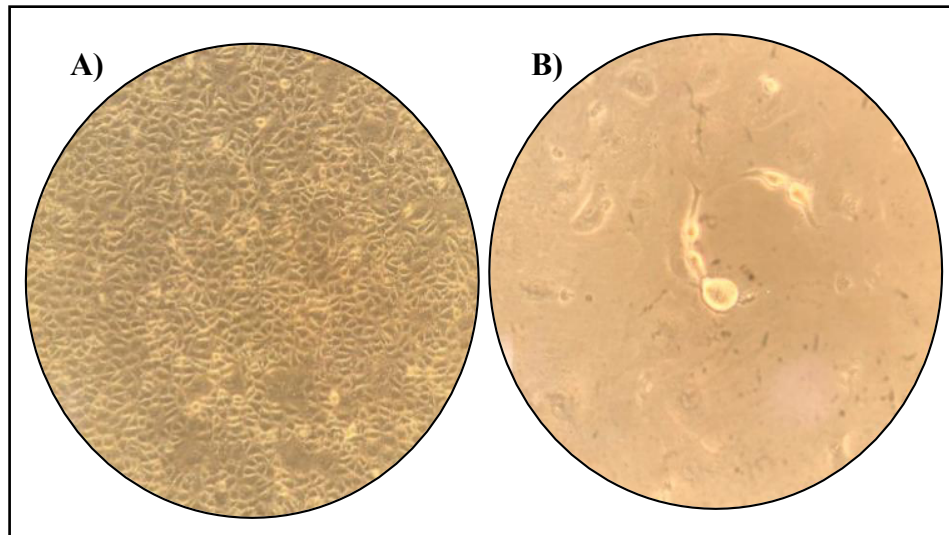


**Figura 4.** Cinética de crecimiento de *Bifidobacterium longum* por turbidimetría a 635 nm durante 15 h.

### 7.1.2 Propagación de RV

El virus fue propagado en células MA-104 durante 24-48 h previamente activado con tripsina, las células fueron monitoreadas hasta observar el efecto citopático característico de rotavirus sobre la línea celular. La célula tiende a alargarse y producir un efecto en forma de rosario (Fig. 5-B), en comparación con las células en estado normal (Fig. 5-A).

La presencia de *Rotavirus wa* en los lisados de células se identificó mediante *SD Rota/Adeno Rapid Test* (SD Bioline, CTR, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.) en el cual se utilizó como control el lisado proporcionado por el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Sonora y como control negativo un sobrenadante de células sin infectar (Fig. 6).



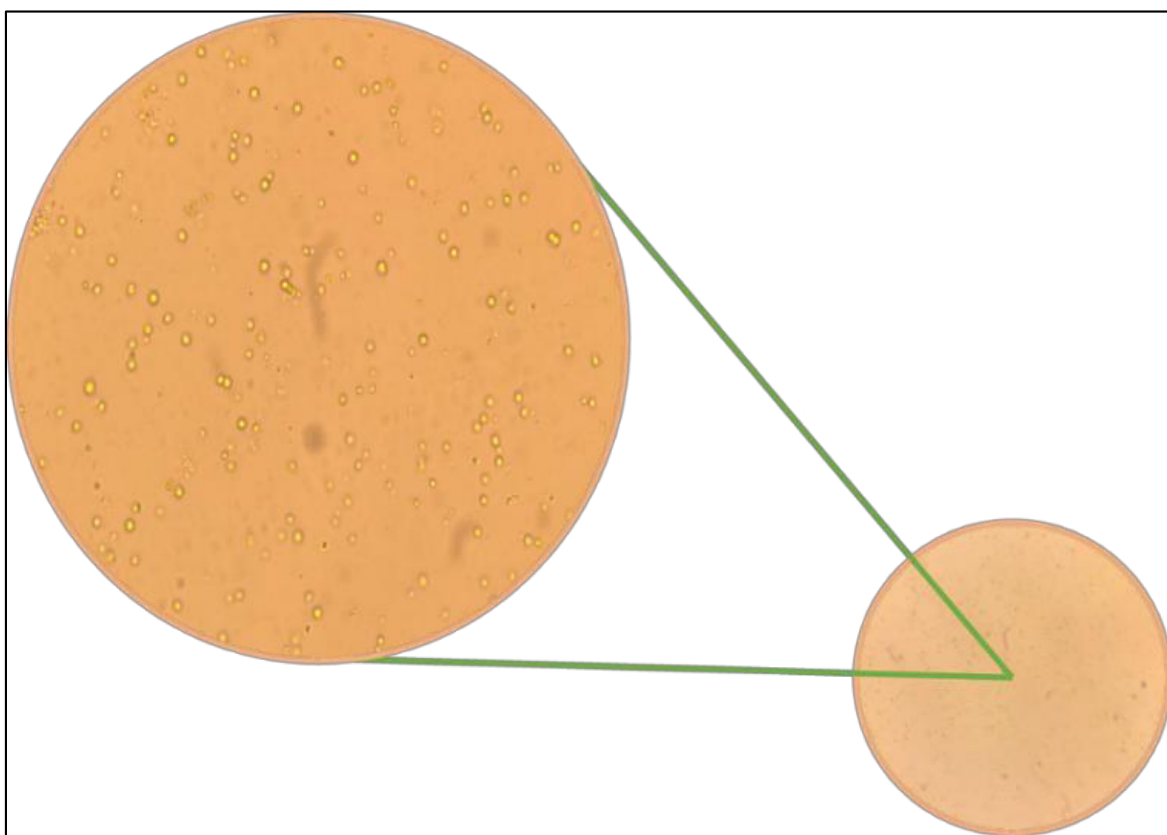
**Figura 5.** Efecto citopático ocasionado por *Rotavirus wa* en células MA-104. A) Mock, B) células infectadas.



**Figura 6.** Prueba rápida en la cual se demuestra la presencia de *Rotavirus wa* en lisados de células MA-104.

## 7.2 Producción de *Chorella sorokiniana*

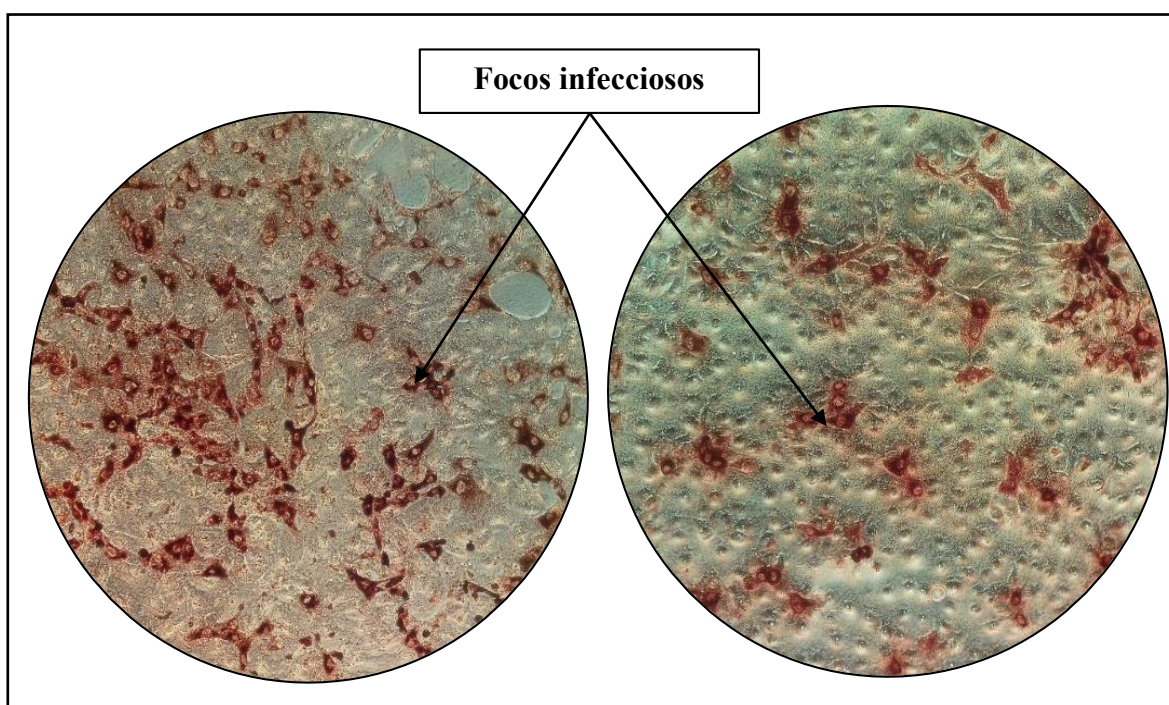
La producción de *C. sorokiniana* se realizó en medio LC a partir de la colección de la Unidad de Formulación de Biológicos, FCB-UANL (Fig. 7). Para lograrlo, el matraz se dejó a temperatura ambiente, en un fotoperiodo constante durante 30 días, posteriormente el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min para concentrarlo y almacenarlo a 4 °C en tubos cónicos de 50 mL para su posterior uso, obteniéndose un stock final de 50 mL a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  células/mL.



**Figura 7.** Cultivo de *Chlorella Sorokiniana* a 400 X.

### 7.3 Microtitulación de focos infecciosos

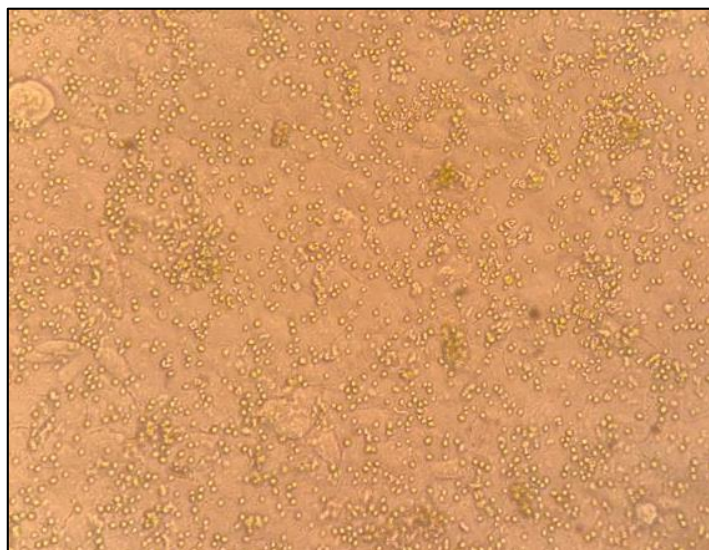
Para la microtitulación de focos infecciosos se usó una placa de 96 pocillos con células MA-104 en confluencia y después del protocolo de tinción se observaron y contaron las UFF por pocillo (Fig. 8), posteriormente se determinó la carga viral de los 50 mL de lisado producidos mediante la fórmula descrita en la metodología (Sección 6.6) (Medina, 2019), calculándose una carga viral de 359,040 UFF/mL.



**Figura 8.** Tinción de Focos infección en células MA-104.

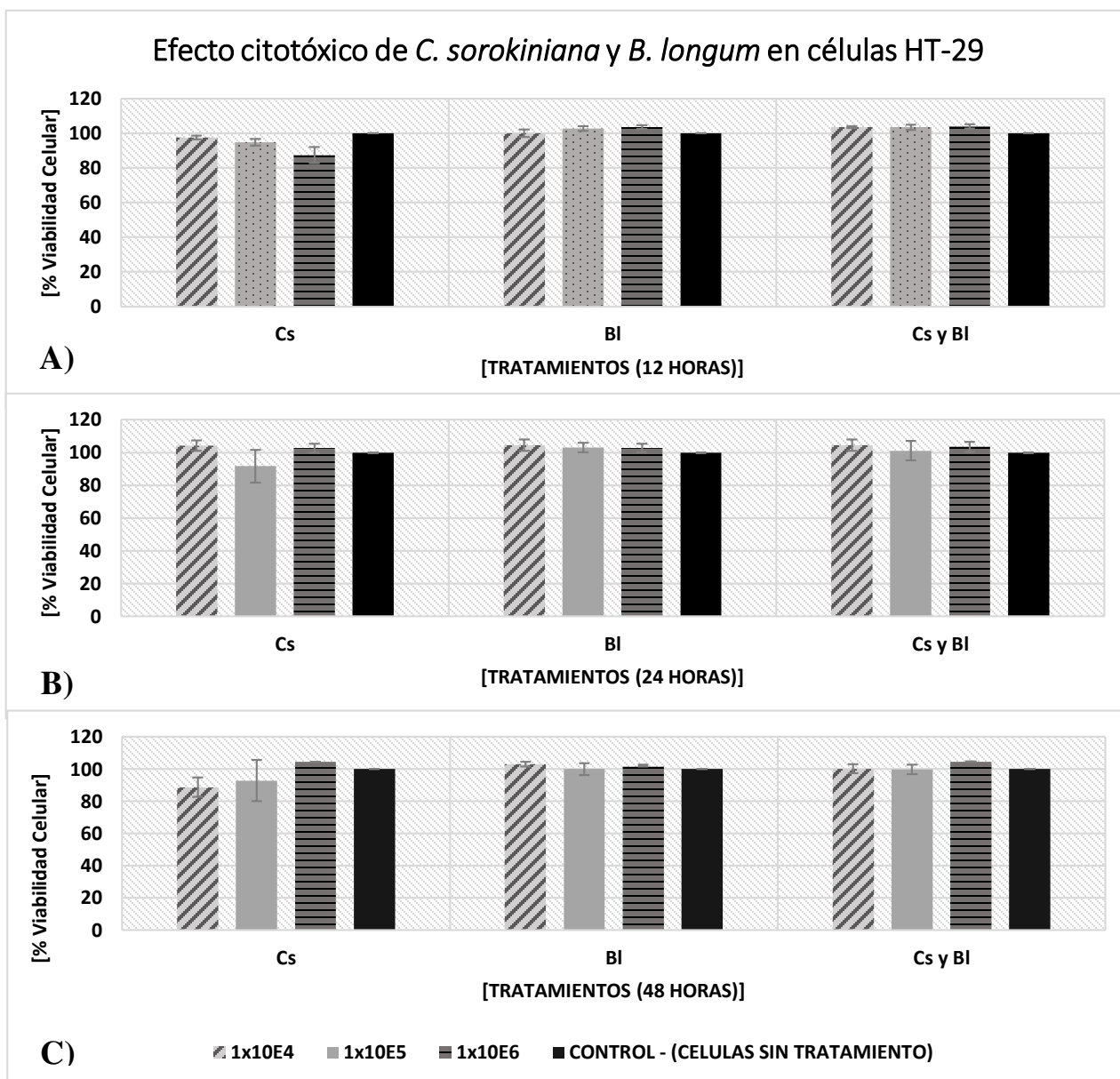
## 7.4 Viabilidad celular

*C. sorokiniana* y *B. longum* fueron expuestos sobre la línea celular HT-29 en un rango de concentraciones ( $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  células/mL) para determinar el efecto citotóxico que pudiera ejercerse sobre la línea celular (Fig. 9).



**Figura 9.** *Chlorella sorokiniana* en contacto con células HT-29

El uso individual de *C. sorokiniana* mostro no ejercer efecto citotóxico ante la línea celular HT-29 a la concentración de  $1 \times 10^6$  a las 24 h (102.68 % de viabilidad) y 48 h (104.35). Por otro lado *B. longum* al igual que *C. sorokiniana* no mostro efecto citotóxico a las 12 h (103.60 %), 24 h (102.76 %) y 48 h (101.68 %) a la concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Mientras que, en la combinación de ambos, los resultados sobrepasaron del 100% de viabilidad celular a las tres concentraciones evaluadas ( $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  células/mL) (Fig. 10).



**Figura 10.** Efecto citotóxico de *C. sorokiniana* y *B. longum* ante la línea celular HT-29. A) 12 h de tratamiento. B) 24 h de tratamiento. C) 48 h de tratamiento. Las barras horizontales representan la Desviación media de 3 réplicas *in vitro*.

## 7.5 Inhibición del efecto citopático

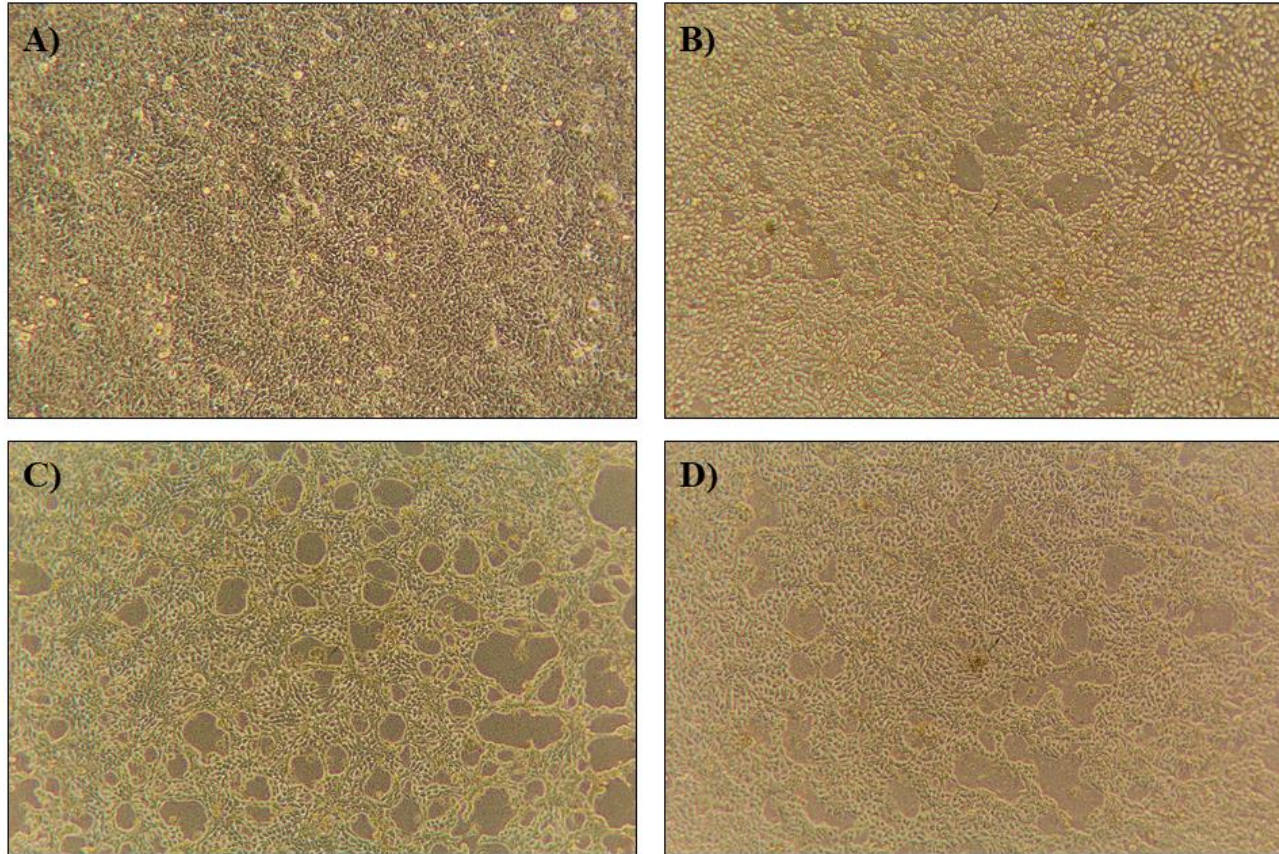
Se realizó un ensayo previo para determinar el efecto citopático de *Rotavirus wa* sobre la línea celular HT-29 junto con los tratamientos a base de *C. sorokiniana* y *B. longum* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL (separados y en combinación), empleados en pre y post-infección con una MOI de infección de 0.1, dejándolos en incubación por 24 h.

El efecto citopático en células HT-29 por *Rotavirus wa* se redujo al 20 % a las 24 h en la post-infección viral, y 10 % en la pre-infección cuando fueron expuestas a *C. sorokiniana* en comparación con las células no infectadas, mientras que con *B. longum* se redujo hasta un 30 % en la post-infección viral y el 20 % en la pre-infección (Fig. 11-12).

Se observó que en la implementación de la combinación de ambos, ejercen un efecto aditivo en la reducción del efecto citopático ocasionado por el virus del 50 % en la post-infección y un 35 % en la pre-infección (Fig. 11-12).

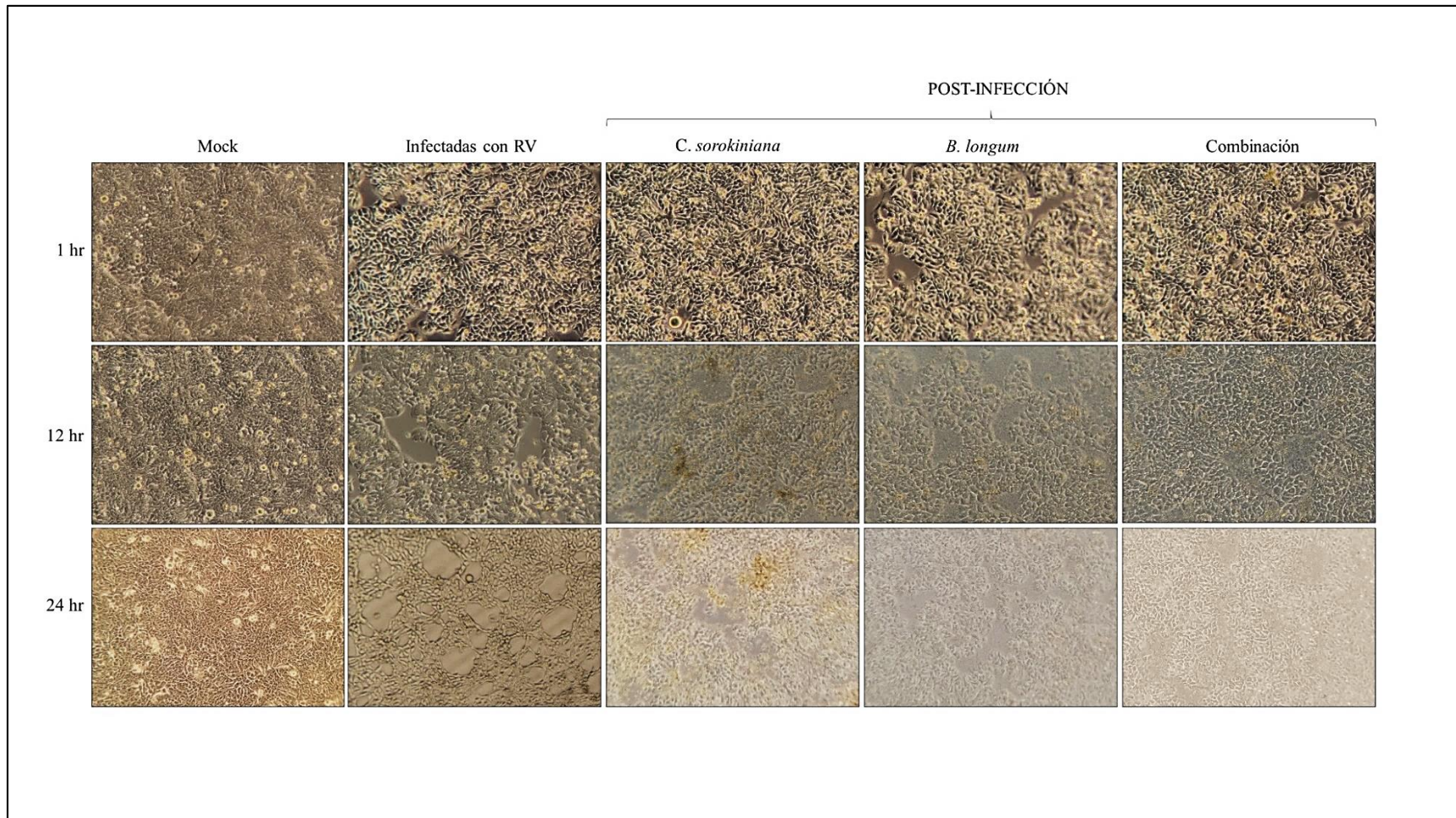


### PRE-INFECCIÓN



**Figura 11.** Efecto citopático en células HT-29 producido por *Rotavirus wa* a una MOI de 0.1 a las 24 h, tratadas en la pre-infección a  $1 \times 10^6$  UFC/mL:  
A) MOCK. B) *C. sorokiniana*. C) *B. longum*. D) *C. sorokiniana* y *B. longum*.

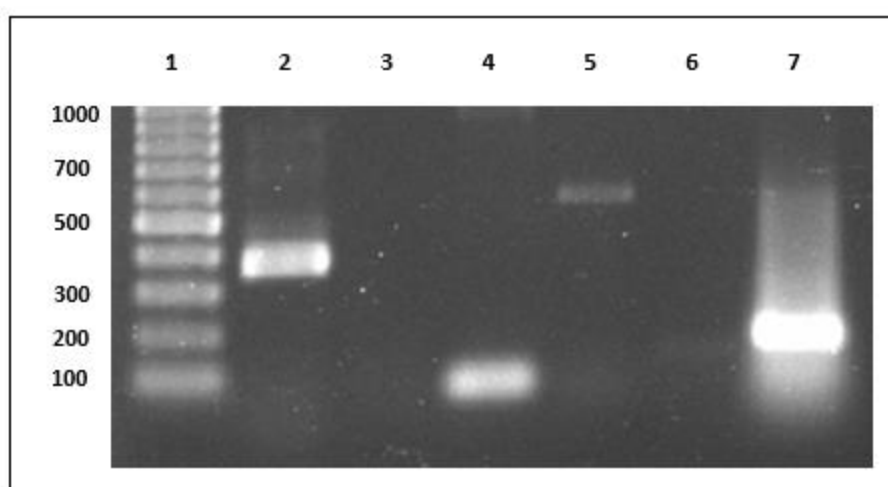




**Figura 12.** Efecto citopático en células HT-29 producido por *Rotavirus wa* a una MOI de 0.1 a las 24 h, tratadas en la post-infección con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  UFC/mL).

## 7.6 Evaluación de interferones y precursores de interferón en células HT-29 en estado basal

La evaluación de la expresión basal de los interferones y sus precursores (INF- $\alpha$ , IRF-3, IRF-5 y RIG-1) sobre células HT-29 fueron detectados mediante RT-PCR en células HT-29 (Fig. 13). Se logró amplificar la secuencia parcial correspondiente a INF- $\alpha$ , IRF-3, IRF-5 y RIG-1, esto con la finalidad de probar los cebadores antes de ser sometidos a RT-qPCR. No fue posible lograr la amplificación parcial de los genes INF- $\beta$  y SOCS3.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR de secuencias parciales de interferones y precursores de interferón expresados en células HT-29. Carril: 1) Marcador de pares de bases 1,000 Kb. 2) INF $\alpha$  369 pb. 3) INF $\beta$  (-). 4) IRF3 65 pb. 5) IRF5 564 pb. 6) SOCS3 (-) pb. 7) RIG1 168 pb.

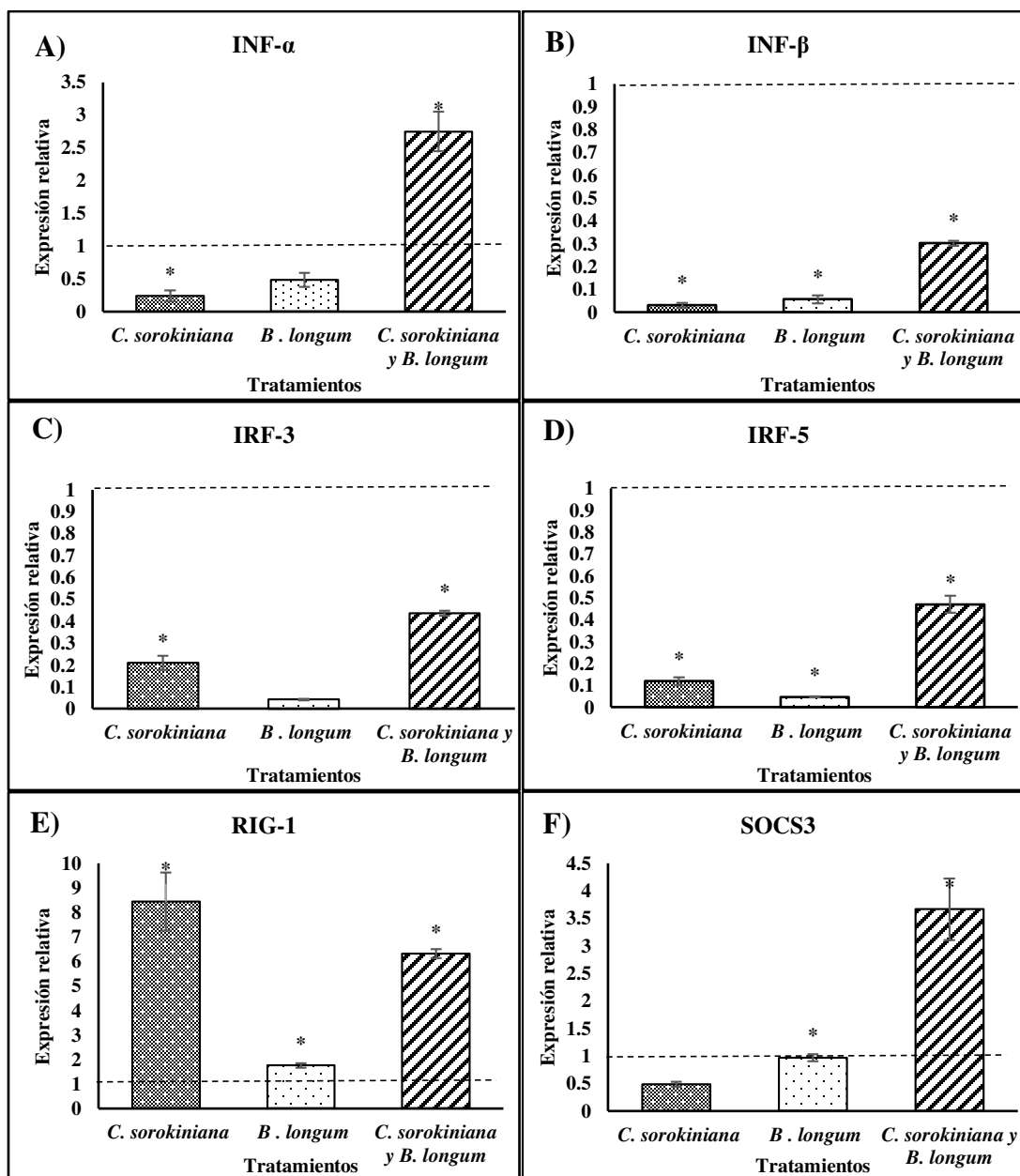
## 7.7 Citocinas expresadas en células HT-29 tratadas con *C. sorokiniana* y *B. longum*

Se trataron células HT-29 con *C. sorokiniana* y *B. longum* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL durante 24 h, esto con la finalidad de medir la capacidad inmunomoduladora en la sobreexpresión de los precursores de interferón (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-3, IRF-5, RIG-1 y SOCS3) y de algunos factores clave involucrados en la regulación, señalización y producción de diversas citocinas para mantener a la célula en un estado antiviral.

Los tratamientos a base *C. sorokiniana* ejercieron una sobreexpresión de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-3 y IRF-5 que osciló entre 0.03-0.24 más con respecto al control, mientras que RIG-1 y SOCS3 se expresó 8.43-0.48 veces más respectivamente (Fig. 14). En cambio, la expresión génica resultante de los tratamientos a base de *B. longum* incremento 1.75 veces más los niveles de expresión de RIG-1, en comparación con el resto de los genes evaluados, los cuales arrojaron niveles de expresión menores a 1, todo esto respecto al control. Sin embargo, los tratamientos combinados de *C. sorokiniana* y *B. longum* incrementaron la sobreexpresión de todos los factores evaluados de 0.3-6.3 veces más, lo cual indica un efecto aditivo en la implementación del probiótico y prebiótico en combinación (Tabla 2).

**Tabla 2. Nivel de expresión génica de los tratamientos evaluados en células HT-29.**

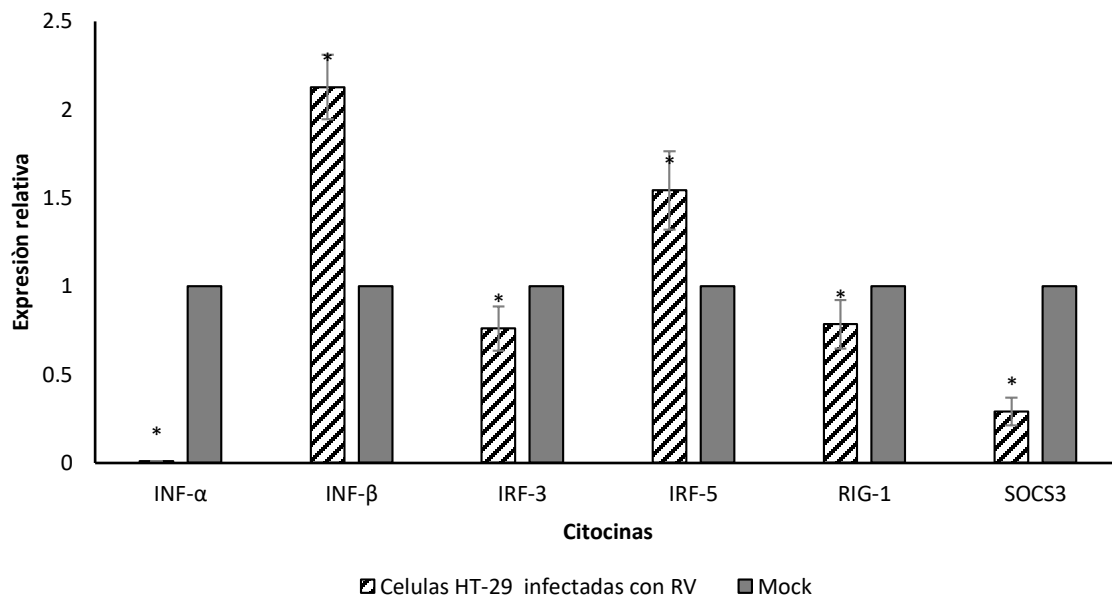
TRATAMIENTOS	CITOCINAS					
	INF- $\alpha$	INF- $\beta$	IRF-3	IRF-5	RIG-1	SOCS3
<i>C. sorokiniana</i>	0.24022222	0.03114666	0.20936855	0.11926432	<b>8.43111749</b>	0.48226279
<i>B. longum</i>	0.48636959	0.05685481	0.04224623	0.04727758	1.75440648	0.96527509
<i>C. sorokiniana</i> + <i>B. longum</i>	<b>2.74723971</b>	<b>0.30200271</b>	<b>0.43625682</b>	<b>0.47052627</b>	6.30849495	<b>3.66175846</b>



**Figura 14.** Expresión génica de citocinas en células HT-29 expuestas a *C. sorokiniana* y *B. longum*. El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1), como lo indican la línea punteada. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes. A) INF- $\alpha$ , B) INF- $\beta$ , C) IRF-3, D) IRF-5, E) RIG-1 y F) SOCS3. (\* $p < 0.05$ ).

### 7.8 Citocinas expresadas en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa*

Las células HT-29 fueron infectadas con *Rotavirus wa* a una MOI de 0.1 por 24 h, con la finalidad de medir los niveles de expresión de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-3, IRF-5, RIG-1 y SOCS3. Obteniendo una disminución en la expresión de la mayoría de los genes evaluados. Los interferones de tipo I (INF- $\alpha$  y INF- $\beta$ ) se expresaron del 0.008 y 2.126 veces más respecto al MOCK en comparación con los precursores de interferón IRF-3 y IRF-5 los cuales se expresaron 0.76 y 1.54 veces más respectivamente. No obstante, los niveles de expresión correspondientes a SOCS3 y RIG-1 fueron de 0.289 y 0.784 veces más (Fig. 15) (Tabla 3).



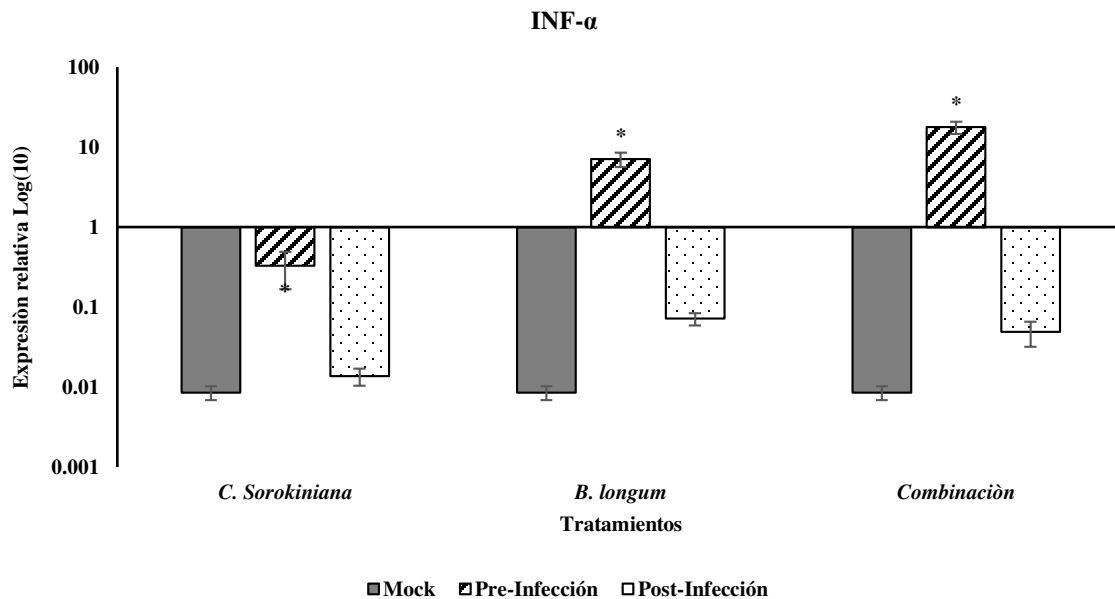
**Figura 15.** Expresión génica de citocinas en células HT-29 infectadas con RV Wa (MOI 0.1). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como MOCK células sin infectar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $p < 0.05$ ).

**Tabla 3. Nivel de expresión génica en células HT-29 infectadas con RV Wa.**

	CITOCINAS					
	INF- $\alpha$	INF- $\beta$	IRF-3	IRF-5	RIG-1	SOCS3
<b>Células HT-29 infectadas con RV</b>	0.00850019	<b>2.12643458</b>	0.76013529	1.54298874	0.78411159	0.28999753
<b>Mock</b>	1	1	1	1	1	1

## 7.9 Citocinas expresadas en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* tratadas en la pre y post-infección con *C. sorokiniana* y *B. longum*

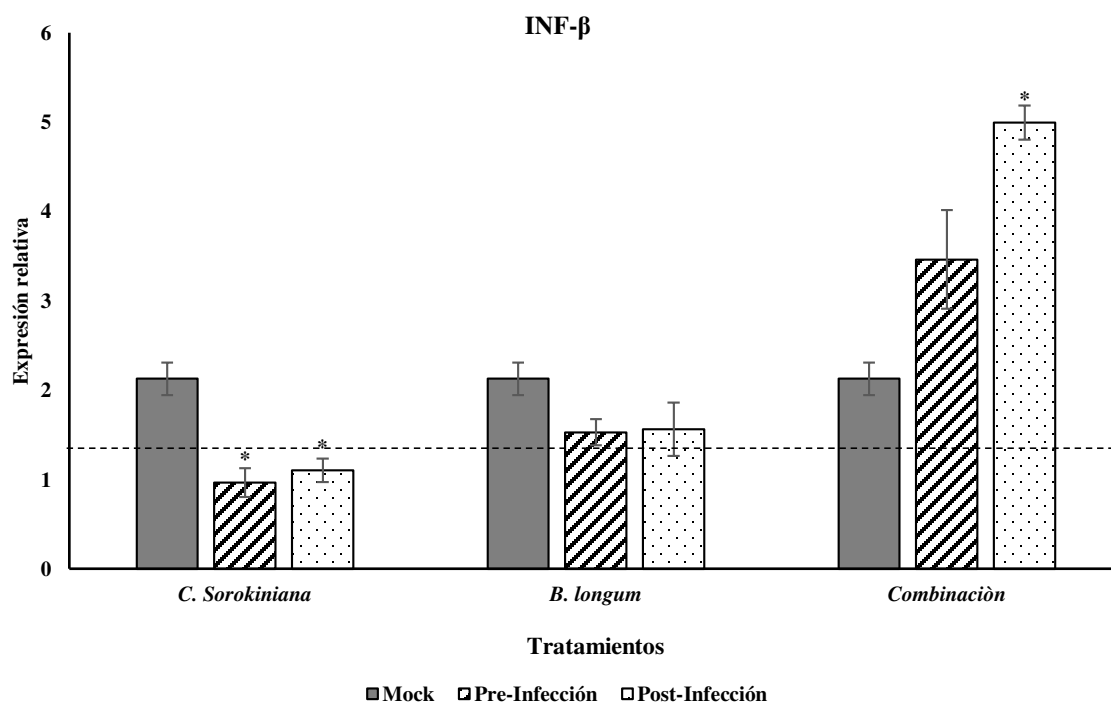
Las células HT-29 fueron infectadas con *Rotavirus wa*, las cuales fueron sometidas a tratamientos en la pre- y post-infección viral con *C. sorokiniana* y *B. longum* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL durante 24 h. Esto con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de diversas citocinas que se ven involucradas en mantener en un estado antiviral a la célula. Los resultados demostraron que la expresión de INF- $\alpha$  aumentó altamente significativo en los tratamientos sometidos en la pre-infección viral con respecto a los de la post-infección, resultando una expresión de 0.326 veces más ( $p = 0.022$ ) en el tratamiento con *C. sorokiniana* y 7.07 ( $p < 0.001$ ) con *B. longum*. Por otro lado, en combinación se obtuvo una expresión de 17.80 ( $p < 0.001$ ) veces más con respecto al control. Mientras que los tratamientos en la post-infección tuvieron poco efecto sobre la expresión de INF- $\alpha$  (Fig. 16).



**Figura 16.** Expresión de INF- $\alpha$  en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* (MOI 0.1) y tratadas en la pre y post-infección a las 24 h con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  células/mL). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos aplicados durante la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1). Como MOCK se utilizaron células infectadas sin tratar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $P < 0.05$ ).

Los niveles de expresión de INF- $\beta$  en las células HT-29 aumento 0.966 ( $p = 0.004$ ) veces en los tratamientos aplicados a base de *C. sorokiniana* en la pre-infección viral, mientras que en la post-infección 1.103 ( $p = 0.008$ ) (Fig. 16). Por otro lado, los niveles de expresión de INF- $\beta$  aumentaron en 1.527 ( $p = 0.132$ ) más en la pre-infección con los tratamientos a base de *B. longum*, mientras que en la post-infección aumentó 1.558 ( $p = 0.194$ ).

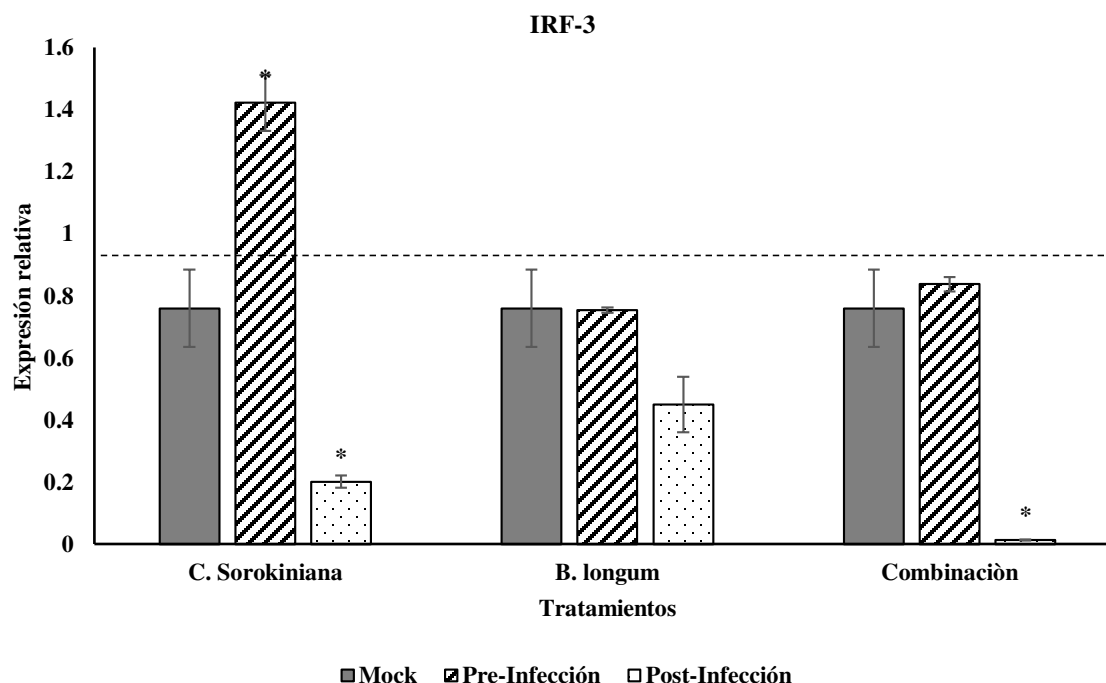
Sin embargo, cuando los tratamientos fueron aplicados en combinación los niveles de expresión se elevaron significativamente 4.99 ( $p = 0.002$ ) veces más en los tratamientos en la post-infección, a diferencia de los valores obtenidos en la pre-infección [3.460 ( $p = 0.075$ )] (Fig. 17).



**Figura 17.** Expresión de INF- $\beta$  en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* (MOI 0.1) y tratadas en la pre y post-infección a las 24 h con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  células/mL). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos aplicados durante la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1), como lo indican la línea punteada. Como MOCK se utilizaron células infectadas sin tratar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $P < 0.05$ ).

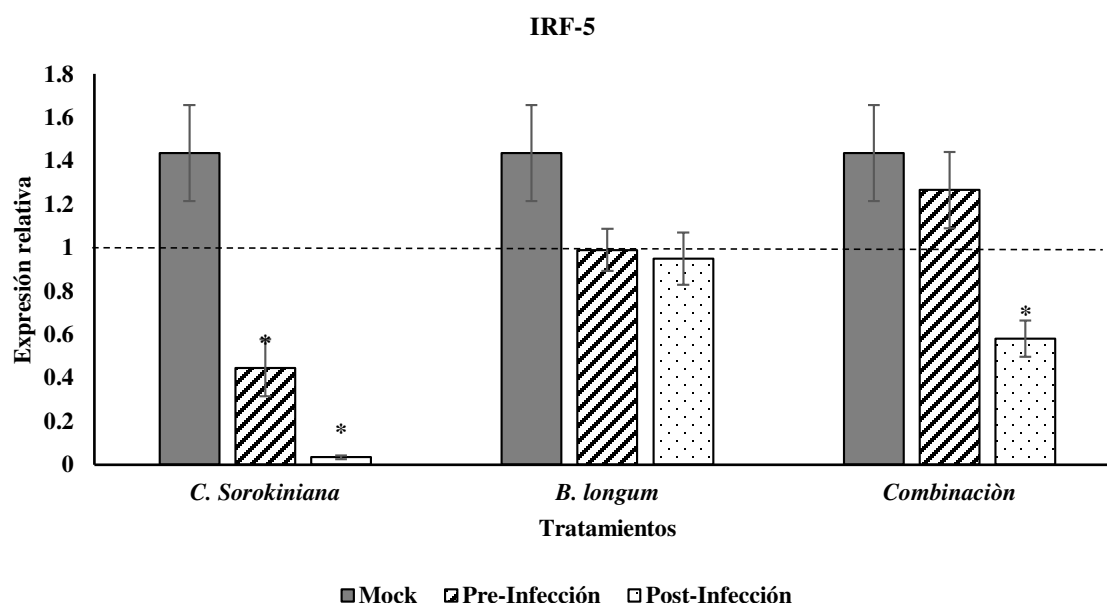


Los niveles de expresión del precursor de interferón IRF-3 se mantuvieron ligeramente suprimidos para ambos tratamientos (pre- y post-infección). A diferencia de los tratamientos a base de *C. sorokiniana*, los cuales arrojaron resultados significativos en la sobreexpresión del gen 1.422 ( $p \leq 0.001$ ) veces más con respecto al control (Fig. 18).



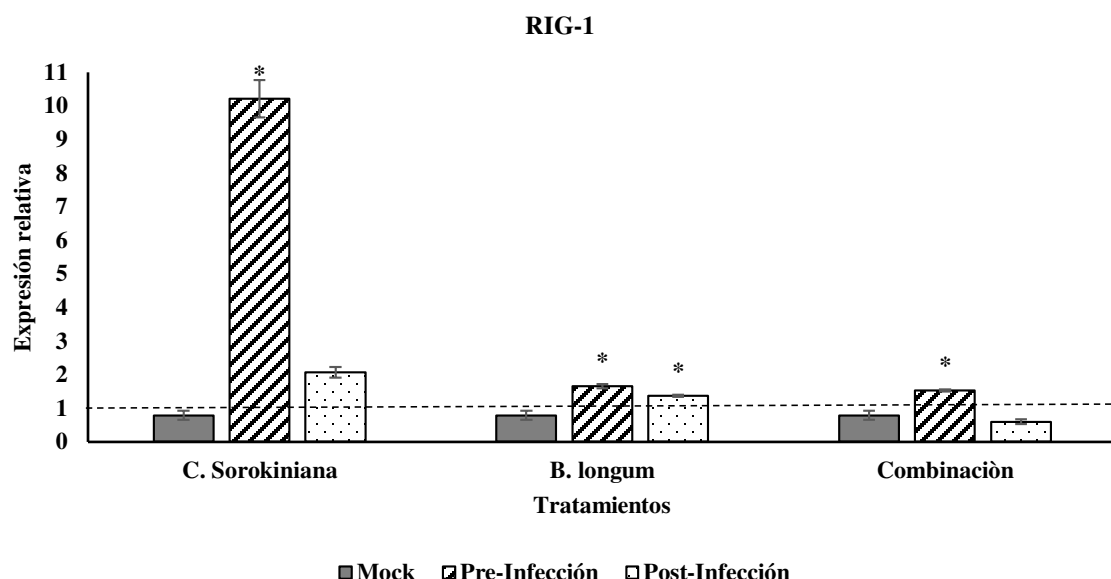
**Figura 18.** Expresión de IRF-3 en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* (MOI 0.1) y tratadas en la pre y post-infección a las 24 h con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  células/mL). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos aplicados durante la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1), como lo indican la línea punteada. Como MOCK se utilizaron células infectadas sin tratar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $P < 0.05$ ).

Los niveles de expresión del precursor de interferón IRF-5, se suprimieron significativamente en los tratamientos a base de *C. sorokiniana* [0.446 ( $p = 0.011$ ) y 0.034 ( $p = 0.002$ ) veces más] sometidos en la pre y post-infección viral. Por otro lado, los tratamientos a base de *B. longum* tuvieron poco efecto sobre la expresión del gen en los tratamientos sometidos en la pre- y post-infección viral. Los niveles de expresión se elevaron 1.265 veces cuando se sometió el tratamiento en combinación en la pre-infección (Fig. 19).



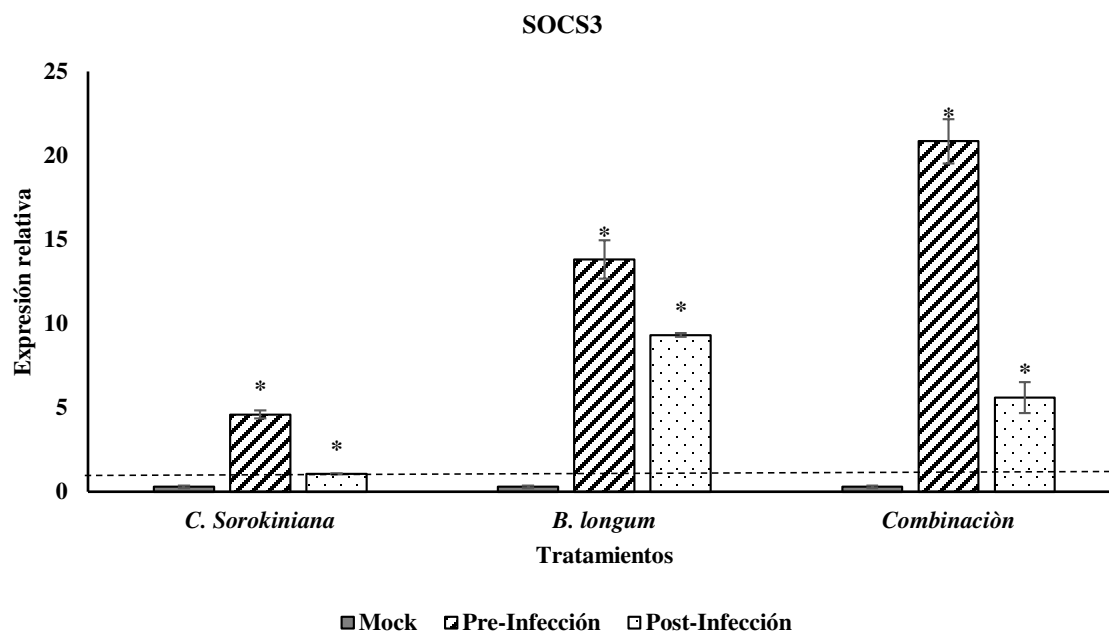
**Figura 19.** Expresión de IRF-5 en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* (MOI 0.1) y tratadas en la pre y post-infección a las 24 h con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  células/mL). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos aplicados durante la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1), como lo indican la línea punteada. Como MOCK se utilizaron células infectadas sin tratar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $P < 0.05$ ).

Por otro lado, los resultados demostraron que la expresión del receptor de reconocimiento asociado a patrones virales RIG-1, aumentó significativamente ( $p \leq 0.001$ ) 10.208 veces más en los tratamientos sometidos en la pre-infección viral a base de *C. sorokiniana*. A diferencia de esto, los tratamientos a base de *B. longum* indujeron la expresión del gen 1.652 veces más en la pre-infección y 1.371 en la post-infección. Sin embargo, cuando los tratamientos son sometidos en combinación, estos resultan no son tan favorables en la expresión del gen (Fig. 20).



**Figura 20.** Expresión de RIG-1 en células HT-29 infectadas con *Rotavirus wa* (MOI 0.1) y tratadas en la pre y post-infección a las 24 h con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  cel/mL). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos aplicados durante la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1), como lo indican la línea punteada. Como MOCK se utilizaron células infectadas sin tratar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $P < 0.05$ ).

Otro gen evaluado en este estudio fue el gen supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS3) el cual se expresó significativamente en todos los tratamientos (pre y post-infección). Sin embargo, el tratamiento con mayor expresión significativa fue el que se implementó en combinación (*C. sorokiniana* y *B. longum*) en la pre-infección viral, expresándose 20.868 ( $p \leq 0.001$ ) veces más respecto al control (Fig. 21).



**Figura 21.** Expresión de SOCS3 en células HT-29 infectadas con RV Wa (MOI 0.1) y tratadas en la pre y post-infección a las 24 h con *C. sorokiniana* y *B. longum* ( $1 \times 10^6$  células/mL). El gráfico indica el cambio de los niveles de expresión con respecto a los tratamientos aplicados durante la infección por RV. La cuantificación relativa se realizó mediante el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta$  Ct), utilizando como calibrador células sin tratamiento (cambio de pliegue = 1), como lo indican la línea punteada. Como MOCK se utilizaron células infectadas sin tratar. Las barras horizontales representan el error típico de tres replicas independientes *in vitro*. (\* $P < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

La gastroenteritis por rotavirus es una de las enfermedades más importantes en los países en vía de desarrollo, el cual afecta principalmente a niños menores de cinco años (Tate et al., 2008). En la actualidad, las vacunas representan la mejor opción en la prevención de la gastroenteritis ocasionada por rotavirus. Sin embargo, estas no le confieren al huésped protección en su totalidad, lo cual se ve reflejado con la incidencia de más casos reportados, así como el aumento de otros virus entéricos como Norovirus (Ozcana et al., 2017). Diversos estudios han sido enfocados en establecer o generar nuevas estrategias para el control o ya sea en la disminución de su severidad. Se ha demostrado la existencia de diferentes mecanismos por los cuales los probióticos y sus productos metabólicos estimulan y generan un estado de defensa a la célula (Bermudez-Brito et al., 2012, Botić et al., 2007, Olaya et al., 2016, Varyukhina et al., 2012). Esto se relaciona con nuestros resultados *in vitro* los cuales demostraron la reducción del efecto citopático ocasionado por *Rotavirus wa* sobre la línea celular HT-29, tratadas con *B. longum* y *C. sorokiniana*, comprobando su efecto simbiótico en la disminución del efecto citopático ocasionado por este virus obteniendo un 50% en el efecto citopático en la post-infección y un 35% en la pre-infección previamente tratadas con *C. sorokiniana* y *B. longum*. Esto, concuerda con otros estudios en donde el efecto combinado de los probióticos *Bifidobacterium adolescentis* y *Lactobacillus casei* disminuyó el efecto citopático hasta un 80% en células MA-104 en la interacción célula-célula (Fernández et al., 2018). Estudios recientes han demostrado que la implementación de prebióticos incrementa la proliferación de bacterias benéficas, ayudando a la regulación del sistema inmunológico del huésped (Colbère et al., 2007).

Aunque existan estudios en los cuales se demuestra que *C. sorokinina* presenta propiedades oncogénicas contra la línea celular L5178Y-R (Reyna et al., 2018). Nuestros resultados demuestran que *C. sorokinina* no presenta citotoxicidad sobre la línea celular HT-29, lo cual indica que puede ser compatible como prebiótico en células intestinales y ser utilizado en diversos tratamientos en la evaluación de la respuesta inmunológica celular.

Se ha reportado que la actividad antiviral celular está dada por la activación de interferones (IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , RIG-1, IRF-3), sin embargo, se basan principalmente por la inducción específica de cepas de probióticos sobre células dendríticas, macrófagos y epitelio

intestinal (Weiss et al., 2011; He et al., 2013; Ishizuka et al., 2016;). Estudios preliminares en el laboratorio, demuestran que la implementación de metabolitos excretados por *C. sorokiniana* ayudan a la disminución del 94.34% de títulos virales de rotavirus en células HT-29, lo cual podría estar relacionado con otros estudios en los que usan moléculas derivadas de microalgas del género *Chlorella* las cuales tienen la capacidad de modular la expresión de INF- $\gamma$  confiriéndole a la célula en estado antiviral (Hasegawa et al., 1999, Queiroz et al., 2003, Kwak et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que metabolitos del género *Chlorella* poseen un efecto antiviral contra otros tipos de virus, como el virus de la hepatitis C (Ozacar et al., 2013).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la inducción específica de RIG1 y SOCS3 respecto a las células no tratadas, lo que sugiere que *C. sorokiniana* y *B. longum* modulan coordinadamente la expresión de estos genes los cuales encabezan las vías de señalización de interferones de tipo I y III, los cuales se encargan de conferirle a la célula un estado antiviral y así disminuir el efecto citopático ocasionado por *Rotavirus wa* (Holloway et al., 2003). Estos IFN regulan de manera coordinada el desarrollo de respuesta inmunitaria adaptativa contra patógenos virales (Kotenko et al., 2003). Lo cual podría estar relacionado con otros estudios en los cuales demuestran que varias cepas de rotavirus suprimen la producción de INF de tipo I en células infectadas a través de sus propios mecanismos como la cepa RV SA11 de simio, RV Wa humano y RV B641 bovino (Graff et al., 2007; Holloway et al., 2009).

En este estudio se observó que los tratamientos combinados a base de *C. sorokiniana* y *B. longum* en células HT-29 pre-infectadas con *Rotavirus wa* aumenta los niveles de expresión de los INF de tipo I (INF- $\alpha$  y INF- $\beta$ ) en la pre y post-infección viral respecto a las células sin tratar. Estos resultados proporcionan evidencia adicional de que la utilización combinada de probióticos (*B. longum*) y prebióticos (*C. sorokiniana*) puede restaurar la expresión de IFNs de tipo I y aumentar la inmunidad antiviral de la célula.

La activación del estado antiviral y la inducción de la expresión de INF- $\alpha$  y INF- $\beta$  están directamente moduladas por los factores de transcripción IRF, de los cuales IRF-3, IRF-5 y IRF-7 han sido implicados como reguladores clave en la expresión final de este tipo de INF (Taniguchi et al., 2001). Por otro lado, rotavirus mediante sus proteínas no estructurales inhibe la expresión de INF- $\alpha$  y INF- $\beta$ , bloqueando la vía de señalización de los IRFs

(Holloway et al., 2009). Nuestros resultados muestran que la utilización de *C. sorokiniana* en la pre-infección aumenta los niveles de expresión de IRF-3, mientras que en la combinación con *B. longum* aumentó los niveles de expresión de IRF-5.

Por otro lado, en la evaluación de la expresión relativa del gen supresor de citocinas SOCS3 aumento significativamente después de la aplicación de los tratamientos a base de *C. sorokiniana* y *B. longum* en la pre y post-infección viral, al igual que el receptor de ARN viral RIG-1. Esto concuerda con estudios realizados por Vlotides et al. (2004) en donde evaluaron estos genes al estar alterados por una infección por rotavirus. Estos resultados pueden proporcionar un mecanismo sólido para explicar cómo los tratamientos a base de *C. sorokiniana* y *B. longum* incrementan la expresión de diversos genes involucrados en mantener a la célula en estado antiviral.

## 9. CONCLUSIONES

- Aplicar *C. sorokiniana* en la pre-infección viral incrementa la expresión de IRF-3, RIG-1 y SOCS3, mientras que en la post-infección sólo se genera una sobreexpresión de RIG-1.
- Aplicar *B. longum* en la pre-infección estimula la expresión de INF- $\alpha$ , RIG-1 y SOCS3, mientras que en la post-infección sólo se sobre-expresa SOCS3.
- Aplicar *C. sorokiniana* y *B. longum* en combinación en la pre-infección estimula la expresión de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-5, RIG-1 y SOCS3, mientras que en la post-infección sólo de INF- $\beta$  y SOCS3, por lo que aplicarlos en la pre-infección es el tratamiento preventivo contra *Rotavirus wa* más adecuado, ya que además estimulan la expresión de Interferones de tipo I (INF- $\alpha$  y INF- $\beta$ ), el cual aumenta la inmunidad antiviral y reduce el efecto citopático en una infección por rotavirus.



## 10. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio muestran que el probiótico *B. longum* y del prebiótico *C. sorokiniana* ejercen una sobreestimulación en la expresión de genes involucrados en mantener a la célula en estado antiviral. Sin embargo, sería de gran interés el estudio de las fracciones celulares de *C. sorokiniana* y *B. longum* con efecto antiviral; así mismo determinar si la actividad se limita a la estimulación de la respuesta inmune celular o podría haber un efecto específico contra rotavirus en particular

Con la evaluación de otros genes involucrados en la respuesta inmune ante patógenos virales como los interferones de tipo III (INF- $\gamma$ ), u otros factores involucrados en la vía de señalización de citocinas como NF-kB y STAT-1, podría quedar más claro, si la inducción de la expresión de estos genes le confieren el efecto antiviral a los probióticos y prebióticos.

También es fundamental, extrapolar este estudio a modelo *in vivo*, para monitorear si la ingesta de *C. sorokiniana* y *B. longum* favorecen la disminución de la sintomatología ocasionada por el virus, así como la reducción del efecto citopático y de esta manera extrapolarlo a diferentes líneas celulares para determinar o hacer comparativas la inducción de la respuesta inmune celular ante otros modelos de infección viral *in vitro* e *in vivo*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, M. 2017. Rotavirus and polymicrobial enteric infections and their short-term course in East African children. H, D Thesis. University of Gothenburg. Sahlgrenska Academy. Sweden. <http://hdl.handle.net/2077/53910>. 81 p.
- Arnold, M. M., y Patton, J. T. 2011. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *Journal of virology*, 85(5), 1970-1979. Doi: 10.1128/JVI.01801-10
- Azcona, O. M., Gómez, L. V., Sánchez, P. B., Soto, R. D., & Suárez, L. M. M. (2017). Acute gastroenteritis and enteric viruses: impact on the detection of norovirus. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 87(3), 143-147.
- Azocar, J., y Diaz, A. 2013. Efficacy and safety of Chlorella supplementation in adults with chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(7), 1085. Doi: 10.3748/wjg.v19.i7.1085
- Bagchi, P., Bhowmick, R., Nandi, S., Nayak, M. K., y Chawla-Sarkar, M. (2013). Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NF $\kappa$ B activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology*, 444(1-2), 41-44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.003>
- Barro, M., y Patton, J. T. 2007. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *Journal of virology*, 81(9), 4473-4481. Doi: 10.1128/JVI.02498-06
- Barrón-González, M. P., Vázquez, G. C. S., Treviño, L. V., Martínez, J. A. V., Vallarte, M. R. M., y Cárdenas, B. D. M. 2008. Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *CIENCIA-UANL*, 11(3), 11.
- Beachboard, D. C., y Horner, S. M. 2016. Innate immune evasion strategies of DNA and ARN viruses. *Current opinion in microbiology*, 32, 113-119.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Mechanisms of action of probiotics. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61, 160-174.

- Bieber, T., & Elsässer, H. P. 2001. Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection. *Biotechniques*, 30(1), 74-7. Doi: <https://doi.org/10.2144/01301st03>
- Blaut, M. (2018). Composition and Function of the Gut Microbiome. In *The Gut Microbiome in Health and Disease* (pp. 5-30). Springer, Cham.
- Botić, T., Danø, T., Weingartl, H., & Cencič, A. (2007). A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *International Journal of food microbiology*, 115(2), 227-234.
- Broquet, A. H., Hirata, Y., McAllister, C. S., & Kagnoff, M. F. (2011). RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1618-1626.
- Chaimongkol, N., Khamrin, P., Suantai, B., Saikhreang, W., Thongprachum, A., Malasao, R., y Maneekarn, N. 2012. A wide variety of diarrhea viruses circulating in pediatric patients in Thailand. *Clinical laboratory*, 58(1): 117.
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., y Desselberger, U. 2017. Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17083.
- Delgado, P., Lizasoain, S., Endrino, A., Olano, A., Corzo, N., & Moreno, F. J. 2016. Elaboración de yogures simbióticos con nuevos ingredientes prebióticos.
- Delgado, S., Guadamuro, L., Flórez, A. B., Vázquez, L., y Mayo, B. 2018. Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high  $\beta$ -glucosidase activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. En prensa. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.018>
- Estes, M., y Greenberg, H, 2013 Rotaviruses. En: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1347-1350.
- Fernandez-Duarte, K. P., Olaya-Galán, N. N., Salas-Cárdenas, S. P., Lopez-Rozo, J., & Gutierrez-Fernandez, M. F. (2018). *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) and *lactobacillus casei* (Lafti L26-DSL): probiotics able to block the in vitro adherence of rotavirus in MA104 cells. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(1), 56-63.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Jimenez-Espinoza, R., Eom, H.J., Block, D.E., y Mills, D.A. 2013. Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. *Food Microbiology*, 33(2): 262-270. Doi: 10.1016/j.fm.2012.10.003.

- Gogineni, V.K., Morrow, L.E., & Malesker, M.A. 2013. Probiotics: mechanisms of action and clinical applications immune modulation. *Journal of Probiotic and Health* 1:1–11. <http://tarjomefa.com/wp-content/uploads/2016/08/4865-English>
- Gomez-Flores, R., Caballero-Hernández, D., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, P., Rice, C.K., Hicks, M.E., y Weber, R.J. 2005. Increased survival of tumor-bearing mice by the delta opioid SNC 80. *Anticancer Research*, 25, 4563-4568.
- Gómez-Rial, J., Sánchez-Batán, S., Rivero-Calle, I., Pardo-Seco, J., Martínón-Martínez, J. M., Salas, A., & Martínón-Torres, F. (2019). Rotavirus infection beyond the gut. *Infection and drug resistance*, 12, 55.
- Gonzalez-Ochoa, G., Flores-Mendoza, L. K., Icedo-Garcia, R., Gomez-Flores, R., y Tamez-Guerra, P. 2017. Modulation of rotavirus severe gastroenteritis by the combination of probiotics and prebiotics. *Archives of microbiology*, 199(7), 953-961. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1400-3>
- Graff, J. W., Ewen, J., Ettayebi, K., & Hardy, M. E. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *Journal of General Virology*, 88(2), 613-620.
- Hasegawa, T., Ito, K., Ueno, S., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., & Yasunobu, Y. (1999). Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *International journal of immunopharmacology*, 21(5), 311-323.
- He, F., Morita, H., Ouwehand, A. C., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Kurisaki, J. I., & Salminen, S. (2002). Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiology and immunology*, 46(11), 781-785.
- Holloway G, Coulson BS. Innate cellular responses to rotavirus infection. *J Gen Virol*. 2013; 94 (Pt 6): 1151-60. Epub 2013/03/15. doi: vir.0.051276–0 [pii] pmid: 23486667.
- Holloway G, Truong TT, Coulson BS (2009) Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *J Virol* 83: 4942–4951.
- Muñoz, J. A. M., Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Ramón, D., Genovés, S., ... & Rivero, M. (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(24), 8775-8783.

- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., & Gibson, G. R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug discovery today*, 8(15), 692-700.
- Nomoto, K. (2005). Prevention of infections by probiotics. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(6), 583-592.
- Holloway, G., Dang, V. T., Jans, D. A., y Coulson, B. S. 2014. Rotavirus inhibits IFN-induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin- $\alpha$ . *Journal of General Virology*, 95, 1723-1733. Doi: 10.1099/vir.0.064063-0
- Holloway, G., Fleming, F. E., y Coulson, B. S. 2018. MHC class I expression in intestinal cells is reduced by rotavirus infection and increased in bystander cells lacking rotavirus antigen. *Scientific reports*, 8(1), 67. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18464-x>
- Ingle, H., Peterson, S. T., & Baldridge, M. T. 2018. Distinct effects of type I and III interferons on enteric viruses. *Viruses*, 10(1), 46. Doi: 10.3390/v10010046
- Ishizuka, T., Kanmani, P., Kobayashi, H., Miyazaki, A., Soma, J., Suda, Y., ... & Saito, T. (2016). Immunobiotic bifidobacteria strains modulate rotavirus immune response in porcine intestinal epitheliocytes via pattern recognition receptor signaling. *PLoS One*, 11(3), e0152416.
- Kawahara, T., Makizaki, Y., Oikawa, Y., Tanaka, Y., Maeda, A., Shimakawa, M., y Taniguchi, K. 2017. Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 alleviates rotavirus gastroenteritis through regulation of intestinal homeostasis by inducing mucosal protective factors. *PloS one*, 12(3), e0173979. Doi: <https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0173979>
- Kirkwood, C. D., Boniface, K., Barnes, G. L., & Bishop, R. F. (2011). Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia. *The Pediatric infectious disease Journal*, 30(1), S48-S53.
- Konar, N., Palabiyik, I., Toker, O. S., Polat, D. G., Kelleci, E., Pirouzian, H. R., y Sagdic, O. 2018. Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Functional Foods*, 43, 206-213. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.016>
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, y otros. Los IFN-lambdas median la protección antiviral a través de un complejo de receptores de

- citoquinas de clase II distinto. *Nat Immunol.* 2003; 4 (1): 69–77. Epub 2002/12/17. pmid: 12483210.
- Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., y Pedersen, O. 2016. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome medicine*, 8(1), 52. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0300-5>
- Kwak, J. H., Baek, S. H., Woo, Y., Han, J. K., Kim, B. G., Kim, O. Y., & Lee, J. H. (2012). Beneficial immunostimulatory effect of short-term *Chlorella* supplementation: enhancement of natural killer cell activity and early inflammatory response (randomized, double-blinded, placebo-controlled trial). *Nutrition Journal*, 11(1), 53.
- Lauzon, H.L., Dimitroglou, A., Daniel, L., Ringø, E., y Davies, S.J. 2014. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. En: *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, Ed. D. Merrifield y E. Ringø. John Wiley & Sons, Ltd. Doi: 10.1002/9781118897263.ch7
- Lee, D. K., Park, J. E., Kim, M. J., Seo, J. G., Lee, J. H., y Ha, N. J. 2015. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 39(2), 237-244. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.09.006>
- Lin, J. D., Feng, N., Sen, A., Balan, M., Tseng, H. C., McElrath, C., ... & Durbin, J. E. (2016). Distinct roles of type I and type III interferons in intestinal immunity to homologous and heterologous rotavirus infections. *PLoS pathogens*, 12(4), e1005600.
- Lin, P. Y., Tsai, C. T., Chuang, W. L., Chao, Y. H., Pan, I. H., Chen, Y. K., y Wang, B. Y. 2017. *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 88. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1611-9>
- Lopez-Chuken, U. J., Young, S. D., & Sanchez-Gonzalez, M. N. (2010). The use of chloro-complexation to enhance cadmium uptake by *Zea mays* and *Brassica juncea*: testing a “free ion activity model” and implications for phytoremediation. *International journal of phytoremediation*, 12(7), 680-696.

- López, S., Sánchez-Tacuba, L., Moreno, J., & Arias, C. F. (2016). Rotavirus strategies against the innate antiviral system. *Annual review of virology*, 3, 591-609.
- Manzano, C., Estupiñán, D., y Poveda, E. 2012. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista chilena de nutrición*, 39(1), 98-110. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., y Johne, R. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*, 157, 1177-1182. Doi: 10.1007/s00705-012-1273-3
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., y Goodfellow, I. 2011. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS pathogens*, 7(12), e1002413. Doi: <https://doi.org/10.1371/Journal.ppat.1002413>
- Miller, L. E., Ouwehand, A. C., y Ibarra, A. 2017. Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal transit in constipated adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of gastroenterology*, 30(6), 629. Doi: 10.20524/aog.2017.0192
- Morelli, M., Ogden, K. M., y Patton, J. T. 2015. Silencing the alarms: innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. *Virology*, 479, 75-84.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunology Methods*. 65, 55–63. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mukherjee, A., Patra, U., Bhowmick, R., y Chawla Sarkar, M. 2018. Rotaviral nonstructural protein 4 triggers dynamin related protein 1 dependent mitochondrial fragmentation during infection. *Cellular microbiology*, 20(6), e12831. Doi: <https://doi.org/10.1111/cmi.12831>
- Nandi, S., Chanda, S., Bagchi, P., Nayak, M. K., Bhowmick, R., y Chawla-Sarkar, M. 2015. Correction: MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1. *PloS one*, 10(6), e 0131956. Doi: <https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0131956>
- Olaya Galán, N. N., Ulloa Rubiano, J. C., Velez Reyes, F. A., Fernandez Duarte, K. P., Salas Cardenas, S. P., & Gutierrez Fernandez, M. F. (2016). In vitro antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection

- monitored by NSP 4 protein production. *Journal of applied microbiology*, 120(4), 1041-1051.
- Olivart, M., Galera, E., y Falguera, M. 2017. Acute gastroenteritis and *Haemophilus parainfluenzae*: An unreported but predictable association. *Gastroenterologia y hepatologia*, 40(1), 23-24. Doi: 10.1016/j.gastrohep.2015.10.010
- Onori, M., Coltella, L., Mancinelli, L., Argentieri, M., Menichella, D., Villani, A., y Russo, C. 2014. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of bacterial and viral enteropathogens in stool samples of paediatric patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 79(2), 149-154. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.004>
- Parche, S., Amon, J., Jankovic, I., Rezzonico, E., Beleut, M., Barutçu, H., Schendel, I., Eddy, M.P., Burkovski, A., Arigoni, y F., Titgemeyer, F. 2007. Sistemas de transporte de azúcar de *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Revista de Microbiología Molecular y Biotecnología*. 12 (1-2), 9-19. Doi: 10.1159/000096455.
- Park, M. S., Kwon, B., Ku, S., y Ji, G. E. 2017. The efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 probiotic treatment in infants with rotavirus infection. *Nutrients*, 9(8), 887. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu9080887>
- Peña, A. S. (2007). Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 99(11), 653.
- Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., y Traynor, J. 2017. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., y Gil, A. 2018. Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients*, 10(1), 42. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu10010042>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & nutrition*, 6(3), 285-306.
- Queiroz, M. L., Rodrigues, A. P., Bincoletto, C., Figueirêdo, C. A., & Malacrida, S. (2003). Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International immunopharmacology*, 3(6), 889-900.



- Ramani, S., Hu, L., Prasad, B. V., y Estes, M. K. 2016. Diversity in rotavirus–host glycan interactions: A “Sweet” Spectrum. *JCMGH*, 2, 263-273. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.03.002>
- Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 42-46.
- Reyna-Martinez, R., Gomez-Flores, R., López-Chuken, U., Quintanilla-Licea, R., Caballero-Hernandez, D., Rodríguez-Padilla, C., y Tamez-Guerra, P. 2018. Antitumor activity of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus* sp. microalgae native of Nuevo León State, México. *PeerJ*, 6, e4358. Doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.4358>
- Rodríguez Lagunas, M. J., Azagra Boronat, I., Saldaña-Ruíz, S., Massot Cladera, M., Rigo-Adrover, M., Sabaté-Jofre, A., y Pérez-Cano, F. J. 2017. Immunomodulatory role of probiotics in early life. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII*, 2017, Research Signpost. Ed., Muñoz-Torrero, D., M. Riu y C. Feliu. pp. 19-34. ISBN: 978-81-308-0573-3.
- Rogawski, E. T., Platts-Mills, J. A., Colgate, E. R., Haque, R., Zaman, K., Petri, W. A., y Kirkpatrick, B. D. 2018. Quantifying the impact of natural immunity on rotavirus vaccine efficacy estimates: a clinical trial in Dhaka, Bangladesh (PROVIDE) and a simulation study. *The Journal of infectious diseases*, 217(6), 861-868. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix668>
- Rosettie, K. L., Vos, T., Mokdad, A. H., Flaxman, A. D., Khalil, I., Troeger, C., y Weaver, M. R. 2018. Indirect Rotavirus Vaccine Effectiveness for the Prevention of Rotavirus Hospitalization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4): 1197-1201. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0705>
- Saavedra, J. M. 2007. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 22(3), 351–65. Accesado el 14 Sept. 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507735>

- Safí, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., y Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Sánchez-Tacuba, L., Rojas, M., Arias, C. F., y López, S. 2015. Rotavirus controls the activation of the OAS/rnase L pathway using at least two distinct mechanisms. *Journal of virology*, JVI-01874. Doi: 10.1128/JVI.01874-15
- Sanneh, B., Sey, A. P., Shah, M., Tate, J., Sonko, M., Jagne, S., y Parashar, U. 2018. Impact of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus diarrhoea in The Gambia. *Vaccine*. En prensa. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.091>
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., & Black, R. E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet infectious diseases*, 6(6), 374-382.
- Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. - C; Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., y Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *PNAS*. 99(22), 14422-14427. Doi: 10.1073/pnas.212527599.
- Sen, A., Sharma, A., y Greenberg, H. B. 2017. Rotavirus degrades multiple type interferon receptors to inhibit IFN signaling and protects against mortality from endotoxin in suckling mice. *Journal of virology*. Doi: 10.1128/JVI.01394-17.
- Sherry B (2009) Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 29: 559–567
- Solano-Aguilar, G., Dawson, H., Restrepo, M., Andrews, K., Vinyard, B., y Urban, J. F. 2008. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Applied and environmental microbiology*, 74(20), 6338-6347. Doi: 10.1128/AEM.00309-08
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology*, 19(1), 623-655.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., & Parashar, U. D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 12(2), 136-141.

- Theamboonlers, A., Maiklang, O., Thongmee, T., Chieochansin, T., Vuthitanachot, V., y Poovorawan, Y. 2014. Complete genotype constellation of human rotavirus group A circulating in Thailand, 2008–2011. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 295-302. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.020>
- Thomas, L. V. (2016). Probiotics—the journey continues. *International Journal of dairy technology*, 69(4), 469-480.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., y Shimosato, T. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and environments*, 30(2), 126-132. Doi: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14176>
- Van Niel, C. W., Feudtner, C., Garrison, M. M., & Christakis, D. A. (2002). Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, 109(4), 678-684.
- Varyukhina, S., Freitas, M., Bardin, S., Robillard, E., Tavan, E., Sapin, C., ... & Trugnan, G. (2012). Glycan-modifying bacteria-derived soluble factors from *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus casei* inhibit rotavirus infection in human intestinal cells. *Microbes and infection*, 14(3), 273-278.
- Vlotides, G., Sörensen, A. S., Kopp, F., Zitzmann, K., Cengic, N., Brand, S., ... & Auernhammer, C. J. (2004). SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN- $\alpha$ -induced expression of the antiviral proteins 2, 5-OAS and MxA. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(3), 1007-1014.
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Betenbaugh, M. J., ... & Qiu, G. (2011). The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(3), 835-844.
- Weiss, G., Christensen, H. R., Zeuthen, L. H., Vogensen, F. K., Jakobsen, M., & Frøkiær, H. (2011). Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon- $\beta$  profiles in dendritic cells. *Cytokine*, 56(2), 520-530.
- Wilson, S. E., Chung, H., Schwartz, K. L., Guttman, A., Deeks, S. L., Kwong, J. C., y Tu, K. 2018. Rotavirus vaccine coverage and factors associated with uptake using linked data: Ontario, Canada. *PloS one*, 13(2), e0192809. Doi: <https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0192809>

- Yıkımsı, S., Aksu, H., Alpaslan, M., y Şimşek, O. 2018. Probiotic microorganisms and encapsulation method approaches. In: Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology (pp. 132-151). IGI Global. Doi: 10.4018/978-1-5225-5363-2.ch008
- Yuan, J., Zhu, L., Liu, X.; Iluminado, T.; Zhang, Y., Ying, T., Wang, B., Wang, J., Dong, H., y Wang, H. 2006. Un mapa de referencia de proteoma y análisis proteómico de *Bifidobacterium longum* NCC2705. Proteómica molecular y celular. 5(6), 1105-1118. Doi: 10.1074/mcp.M500410 MCP200
- Zhang, R., Jha, B. K., Ogden, K. M., Dong, B., Zhao, L., Elliott, R., y Weiss, S. R. 2013. Homologous 2', 5'-phosphodiesterases from disparate ARN viruses antagonize antiviral innate immunity. PNAS, 110(32), 13114-13119. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1306917110>
- Zhu, S., Ding, S., Wang, P., Wei, Z., Pan, W., Palm, N. W., ... & Lei, X. (2017). Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells. Nature, 546(7660), 667.
- Zhu, S., Regev, D., Watanabe, M., Hickman, D., Moussatche, N., Jesus, D. M., y Devabhaktuni, D. 2013. Identification of immune and viral correlates of norovirus protective immunity through comparative study of intra-cluster norovirus strains. PLoS pathogens, 9(9), e1003592. Doi: <https://doi.org/10.1371/Journal.ppat.1003592>

## ANEXO 1

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### Solución LC

En la siguiente tabla se describen las cantidades a utilizadas de reactivos para la preparación del medio de crecimiento de *C. sorokiniana* Solución LC (López et al., 2010).

Reactivo	g/L dH <sub>2</sub> O	mL L <sup>1</sup>
<b>Stock A</b>		
KNO <sub>3</sub>	101.11	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.22	
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	98.6	
<b>Stock B</b>		
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	295.18	5
<b>Stock C</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	1
MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1.81	
Zn S O <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.22	
Cu S O <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.08	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.019	
<b>Stock D</b>		
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1.388	5
Na <sub>2</sub> EDTA	1.833	

### **Medio MPT**

En la siguiente tabla se concentran las cantidades a utilizar para la preparación de 500 mL medio MPT para el crecimiento de *B. longum*.

Reactivos	gr/500 mL
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	1
L-cisteína	1
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	0.1
H <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10

**Nota:** Aforar a 500 mL y ajustar el pH a 7 con NaOH

### **Medio RPMI 1640**

Disolver 10.2 g de medio RPMI 1640 en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada, adicionar 2 g de Bicarbonato de Sodio. Disolver hasta que el bicarbonato de Sodio se haya disuelto. De manera opcional se le agrega el porcentaje de Suero Fetal bobino a trabajar y el antibiótico-antimicótico. Finalmente se esteriliza por medio de filtración al vacío. Almacenar a 4 °C.

### **MTT**

Disolver 250 mg de MTT en polvo en 50 mL de PBS, para posteriormente ajustarlo a 5 mg/mL, después se esterilizó con filtro de 0.22 µm, se guarda en refrigeración. Reactivo sensible a la luz, procurar mantenerlo cubierto.

### **PBS**

Disolver 1.48 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada, después agregar 0.43 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 7.2 g de NaCl, finalmente esterilizar en autoclave.

#### **Sustrato Carbazol para tinción con Inmunoperoxidasa**

Preparar el sustrato para la enzima peroxidasa de rábano, mezclando en el siguiente orden los reactivos: 4.0 ml de buffer de acetatos 0.05M pH 5, 10 µl de peróxido de hidrógeno 30% y 1.5 ml de carbazol (4 mg/ml). Filtrar la mezcla con filtros de 0.22 micras, de preferencia utilizando guantes, ya que el carbazol es tóxico.

#### **Carbazole 4 mg/ml**

Preparar 20 ml de esta solución, pesar 80 mg de carbazol y disolver en 20 ml de N,N-Dimetilformamida. Proteger el frasco de la luz y almacenar la solución a 4°C.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Ricardo Romero Arguelles

Candidato para el grado de:

**Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología**

**Tesis:**

**EFFECTO ANTIVIRAL DE *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* Y *CHLORELLA SOROKINIANA* EN UN MODELO DE INFECCIÓN *IN VITRO***

**Campo de estudio:** Microbiología

### **Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Navojoa, Sonora, el 24 de Octubre de 1993, hijo de Jesús Arguelles Samaniego y Ricardo Romero Arguelles.

**Educación:** Egresado de la Universidad de Sonora, grado obtenido: Licenciado Químico Biólogo Clínico en el 2017 con mención honorífica.